



TITLE:

蛋白質の時間分解構造揺らぎと高速高次構造変化

AUTHOR(S):

寺嶋, 正秀

CITATION:

寺嶋, 正秀. 蛋白質の時間分解構造揺らぎと高速高次構造変化. 2006

ISSUE DATE:

2006-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/79568>

RIGHT:

p.47-540は学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

蛋白質の時間分解構造揺らぎと 高速高次構造変化

課題番号: 1 3 8 5 3 0

平成 13 年度－17 年度科学研究費補助金

基盤研究 (S)

研究成果報告書

平成 1 8 年 3 月

研究代表者 寺嶋正秀

(京都大学大学院理学研究科 教授)

蛋白質の時間分解構造揺らぎと
高速高次構造変化

課題番号: 1 3 8 5 3 0

平成 13 年度－17 年度科学研究費補助金

基盤研究 (S)

研究成果報告書

平成 1 8 年 3 月

研究代表者 寺嶋正秀

(京都大学大学院理学研究科 教授)

目次

はしがき	2
研究組織	
研究経費	
研究成果の概要	
研究の目的および背景	3
研究発表	
学会誌、総説など	4
口頭発表	11
成果	31
発表論文	45

1、はしがき

この報告書は、平成13年－17年度の科学研究助成金（基盤研究（S））による研究成果をまとめたものである。

蛋白質が機能を発現するとき、まず高次構造変化をおこし、蛋白－蛋白相互作用を変え、機能発現に至る。こうした反応機構を明らかにするために、過渡種における反応中間体蛋白質の構造変化や構造の揺らぎ、蛋白－蛋白相互作用を知ることは非常に重要となる。こうした構造変化や揺らぎに対しては古典的熱力学測定が非常に重要であることがこれまでの長い研究の歴史で明らかにされてきたにも関わらず、短時間だけ存在する過渡種に対してはこの従来の手法は無力であり、短寿命種の性質を知るとは非常に困難であった。ここでは時間分解熱力学量測定の手法を開発・発展させ、蛋白質反応に対して、高速構造変化から秒のゆっくりとした変化まで、幅広い時間スケールでエネルギーと高次の構造変化を追跡し、物理化学の視点からその構造やエネルギー変化と機能との関連について明らかにすることを目標とした。このために、独創的技術や手法を開発し、それを用いて多くの研究者が注目している蛋白質の隠された揺らぎや高次構造変化のダイナミクスを明らかにすることを試みた。

こうした目標のもと、本補助金により、以下述べるように、多くの新しい測定法を開発し、他では得られないユニークな知見を得ることができ、目標を達成できたと考えている。これらの研究成果は、多くの研究協力者や共同研究者との議論のもとで達成されたものであり、研究室の学生諸君や先生方にここに心より感謝いたします。

2、研究組織

研究代表者 寺嶋正秀（京都大学大学院理学研究科 教授）

3、研究経費

平成13年度	27,600 千円
平成14年度	23,600 千円
平成15年度	16,500 千円
平成16年度	16,400 千円
平成17年度	9,400 千円
計	93,500 千円

4、研究研究成果の概要

4-1、研究の目的および背景

蛋白質が機能を発現するとき、まず高次構造変化をおこし、蛋白-蛋白相互作用を変え、機能発現に至る。蛋白質は本質的に揺らぎやすい構造を持ち、この揺らぎにより効率的、特異的な反応が起こっているといつて過言ではない。そのため、過渡種ダイナミクスと反応中間体蛋白質の構造変化や構造揺らぎのダイナミクスを知ることが非常に重要である。こうした性質は、熱力学量測定により明らかにされることがこれまでの多くの研究で明らかとされてきた。ところが、従来の熱力学測定手法は、短時間だけ存在する過渡種に対しては無効であった。また、過渡吸収法、ラマン散乱や発光法は特に高時間分解能を有し、比較的局所的な多くの過程を明らかにしてきたが、エネルギーに対しては情報を与えず、高次構造変化や揺らぎに対しての知見はわずかの信号変化より、推測するしかなかった。このように、反応機構を解明する上で重要な、蛋白質の構造と共に変化するエネルギー曲線 (energy landscape) を、実験的に求めることは不可能であった。ここでは、超高速構造変化から秒のゆっくりとした変化まで、 10^{13} に渡る幅広い時間スケールでエネルギーと高次の構造変化を追跡し、生体分子の動的 landscape を描き、物理化学の視点からその構造やエネルギー変化と機能との関連について明らかにすることを目標にした。特に、そのために必要となる技術や手法の開発を行い、多くの研究者が注目している蛋白質の隠された揺らぎや高次構造変化のダイナミクスを明らかにする。

本研究の特色は、独自の手法を用いて、全く新しい蛋白質ダイナミクスの分野を開くところにある。ほとんどの蛋白質の構造変化において、驚くべきことに中間体のエネルギー位置さえ実験的に知られていない。そのため 20 年以上前に低温トラップ法を用いて測定されたデータが今だに多く引用され、それをもとに議論されているのが現状である。凍結状態でのエネルギーが、本当に反応途中のエネルギーや構造を反映するものであるかどうかは常に疑問が投げかけられるところであろうが、現在までの分光法ではそれにかわる手法を持たなかったのである。本研究は、分子の持つ揺らぎやすさやエネルギー変化を時間分解し、過渡種の揺らぎとダイナミクスを結び付ける世界で初めての研究である。またタンパク質の折り畳み問題は、現在非常にホットな分野である。この研究により、構造変化の大きさや速さの情報を得ることで、生体系における精密な分子構築がどのような分子論的機構で働いているのか明らかとなり、生体系での非常に効率のよい反応のメカニズム解明への大きな手がかりとなるであろう。また、生体機能反応を分子科学的に解き明かすための第 1 ステップとなると期待している。

4-2、装置の整備

本研究補助金により光検出器や生体を扱うための機器を導入した。また装置を組み立てるための光学部品や薬品類を購入し、計画に沿った実験を行うことが出来た。

4-3、研究発表

(a) 学会誌、総説など

1. A pH jump reaction studied by the transient grating method: Photodissociation of o-nitro-benzaldehyde.
J.Choi, N.Hirota, M.Terazima, *J.Phys.Chem.A*, **105**,12-18(2001).
2. Dynamics of structure and energy of horse carboxymyoglobin after photodissociation of the carbon monoxide.
M.Sakakura, S.Yamaguchi, N.Hirota, M.Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, **123**, 4286-4294(2001).
3. A spectrally silent transformation in the photolysis of octopus rhodopsin: a protein conformational change without any accompanying change of the chromophore's absorption.
Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, M.Terazima, *Biophy.J.*, **80**,2922-2927(2001).
4. Translational Diffusion of Ion Radicals Created by Electron Transfer in Charged Micellar Solutions probed by the Transient Grating Method and the Taylor Dispersion Method.
K.Okamoto, N. Hirota, T.Tominaga, M. Terazima, *J.Phys.Chem.A*, **105**, 6586-6593(2001).
5. Thermal diffusivities and sound velocities of supercritical methanol and ethanol measured by the transient grating method.
T.Ohmori, Y.Kimura, N.Hirota, M.Terazima, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **3**, 3994-4000 (2001).
6. The structural dynamics and ligand releasing process after the photodissociation of sperm whale carboxymyoglobin.
M.Sakakura, I.Morishima, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, **105**,10424-10434(2001).
7. Carrier dynamics in InGaN/GaN SQW structure probed by the transient grating method with subpicosecond pulsed laser.
K.Okamoto, A.Kaneta, K.Inoue, Y.Kawakami, M.Terazima, G.Shinomiya, T.Mukai, Sg.Fujita, *Phys.Stat.Sol.*, **228**,81 -84(2001).
8. Microscopic Patterning on the Polysilane Films by the Laser Induced Grating Technique.
K. Okamoto, T. Tojo, H. Tada, M. Terazima, K. Matsushige, *Mol.Cryst.Liq.Cryst.*, **370**, 370-382 (2001).
9. Energy conversion process from the photoexcited electronic states studied by the temperature lens and acoustic peak delay methods in solution.
T.Okazaki, N.Hirota, M.Terazima, *J.Mol.Liq.*, **90**,243-249(2001).
10. Rate limitation of photothermal effect in solution.
R.Miyata, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s231-s233(2001).

11. Study on photodissociation of carboxymyoglobin by the transient grating and photoacoustic methods.
M.Sakakura, N.Hirota, K.Konishi, I.Morishima, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s317-s319(2001).
12. The energy and dynamics of photoreaction intermediates of octopus rhodopsin studied by the transient grating method.
Y.Nishioku, N.Hirota, M.Nakagawa, M.Tsuda, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s323-s325(2001).
13. The structural change and energy dynamics in the photocycle of photoactive yellow protein.
K.Takeshita, N.Hirota, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s320-s322(2001).
14. Photothermal processes of wide-bandgap semiconductors probed by the transient grating method.
K.Okamoto, Y.Kawakami, S.Fujita, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s312-s314(2001).
15. Energy dissipation process of photoexcited charge transfer complexes in fluids studied by the transient grating.
N.Saga, Y.Kimura, M.Terazima, N.Hirota, *Anal.Sci.*, **17**, s234-s236(2001).
16. Energy and volume changes on the pH jump process studied by the transient grating technique.
J.Choi, N.Hirota, M.Terazima, *Anal.Sci.*, **17**, s13-s15(2001).
17. 三次の非線形分光法とその応用.
寺嶋正秀、化学工業, 52,254-261(2001).
18. Protein dynamics detected by the time-resolved transient grating technique.
M.Terazima, *Pure Appl.Chem.*, **73**, 513-517(2001).
19. Carrier dynamics in InGaN/GaN SQW structure probed by the transient grating method with subpicosecond pulsed laser.
K.Okamoto, A.Kaneta, K.inoue, Y.Kawakami, M.Terazima, G.Shinomiya, T.Mukai, S.G.Fujita, *Phys.Stat.Sol.*, 228,81-84(2001).
20. Energy transfer from photoexcited electronic states to the thermal modes.
M.Terazima, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 74,595-611(2001).
21. Nonradiative Recombination Processes in GaN-based Semiconductors Probed by the Transient Grating Method.
K. Okamoto, Y. Kawakami, S. Fujita, M. Terazima, and S. Nakamura, *Proc.Int.Workshop on Nitride Semiconductors IPAP Conf. Series* 1.540-543(2001).
22. 蛋白質反応中間体の構造とダイナミクス.
寺嶋正秀、化学 56, 62-63 (2001).

23. Direct observation of the nonradiative recombination processes in InGaN-based LEDs probed by the third-order nonlinear spectroscopy.
K.Okamoto, S.Sajiou, Y.Kawakami, S.Fujita, M.Terazima, G.Shimomiya, T.Mukai, *Light-Emitting Diodes: Research, manufacturing, and Applications V*,4278,150-157(2001).
24. Direct Observation of the Nonradiative Recombination Processes in InGaN-based LEDs probed by the third-order Nonlinear Spectroscopy.
K. Okamoto, S. Saijo, Y. Kawakami, Sg. Fujita, M. Terazima, T. Mukai, G. Shinomiya, S. Nakamura, *Proceedings of SPIE*, **4278**,150-157 (2001)
25. Thermodynamical and transport properties of intermediate states of photo-cyclic reaction of photoactive yellow protein.
K.Takeshita, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima, *Biochemistry*, **41**,3037-3048(2002).
26. Structural dynamics of distal histidine replaced mutants of myoglobin accompanied with the photodissociation reaction of the ligand.
M.Sakakura, I.Morishima, M.Terazima, *Biochemistry*,**41**, 4837-4846(2002).
27. Energetics and Volume Changes of the Intermediates in the Photolysis of Octopus Rhodopsin at a physiological temperature.
Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, M.Terazima, *Biophys.J.*83,1136-1146(2002).
28. Structural change of site-directed mutants of PYP: New dynamics during pR state.
K.Takeshita, Y.Imamoto, M.Kataoka, K. Mihara, F.Tokunaga, M.Terazima, *Biophys.J.*, 83, 1567-1577(2002).
29. Denaturation of a protein monitored by diffusion coefficients: Myoglobin.
J.Choi, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 106,6587-6593(2002).
30. Intermolecular energy transfer from the photo-excited molecule to solvent: Malachite Green.
R.Miyata, Y.Kimura, M.Terazima, *Chem.Phys.Lett.*, **365**, 406-412(2002)
31. 第4回を迎えた日米先端科学シンポジウム.
寺嶋正秀、科学1月号 8-12(2002).
32. 蛋白反応における短寿命中間体の時間分解体積・エンタルピー変化測定.
寺嶋正秀、生物物理、42、87-90(2002).
33. Molecular volume and enthalpy changes associated with irreversible photo-reactions.
M. Terazima, *J.Photochem.Photobiol.C*,24,1-28(2002).

34. Solute Diffusion In The Medium-Density Region of Supercritical Fluids.
Y. Kimura, T. Ohmori, T. Yamaguchi, M. Terazima, Proceedings of the 8th Meeting on Supercritical Fluids "Chemical Reactivity and Material Processing in Supercritical Fluids", ENSCPB (2002).
35. Contribution of hydrogen bonding to the slow diffusion of transient radicals.
K.Okamoto, Y.Nogami, T.Tominaga, M.Terazima, *Chem.Phys.Lett.*, 372,419-422(2003).
36. Diffusion of transient radicals in alcohols and cyclohexane from ambient to supercritical conditions studied by the transient grating method.
T.Ohmori, Y.Kimura, N.Hirota, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 107,5958-5966(2003).
37. Transient thermal expansion of a protein in solution after photo-excitation of the chromophore: deoxymyoglobin.
R.Miyata, M.Terazima, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 76,1707-1712(2003).
38. Photoreaction of caged ATP compound studied by the time-resolved transient grating method.
J.Choi, M.Terazima, *Photochem.Photobiol.Sci.*, 2,767-773(2003).
39. A novel method for study of protein folding kinetics by monitoring diffusion coefficient in time domain.
T.Nada, M.Terazima, *Biophys.J.*, 85,1876-1881(2003).
40. Photochemical reaction of 2-nitrobenzaldehyde by monitoring the diffusion coefficient.
J.Choi, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 107, 9552-9557(2003).
41. Photothermal processes on a fast time scale: a small molecule and a biological protein.
R.Miyata, M.Terazima, *Rev.Sci.Instrum.*, 74, 884-888(2003).
42. Energy releasing and conformational dynamics of stilbene dendrimers upon photoisomerization.
H.Tatewaki, T.Mizutani, J.Hayakawa, T.Arai, M.Terazima, *J.Phys.Chem.A*, 107, 6515-6521(2003).
43. The study on the femtosecond laser-induced refractive index change in a silicate glass by transient lens method.
M.Sakakura, M.Terazima, *Rev.Sci.Instrum.*, 74, 892-894(2003).
44. Vibrational Energy Relaxation of Azulene in Fluids Studied by the Transient Grating Method.
Y. Kimura , Y. Yamamoto, and M. Terazima, Proceedings of the 21th International Conference on Photochemistry, 221, (2003).
45. Energy and Volume Changes Induced by Photoinitiated Proton Releasing Reaction with Apomyoglobin.
J.Choi, M.Terazima, *Rev.Sci.Instrum.*, 74,319-321(2003).

46. Nonradiative recombination processes of carriers in InGaN/GaN probed by the microscopic transient lens spectroscopy.
K.Okamoto, K.Inoue, Y.Kawakami, S.Fujita, M.Terazima, A.Tsujimura, I.Kidoguchi, *Rev.Sci.Instrum.*, 74, 575-577(2003).
47. 蛋白質におけるエネルギー散逸過程.
寺嶋正秀、レーザー研究, 31, 195-201(2003).
48. レーザーによる蛋白質機能解析の新技术.
寺嶋正秀、医学のあゆみ, 204, 751-752(2003).
49. 化学便覧
寺嶋正秀、第5版 (14章、(14.5.1 - 14.5.3) 屈折率) 丸善
50. 研究室によろこ.
寺嶋正秀、化学、58, 31-34(2003).
51. 熱力学量の時間分解計測法とその応用.
寺嶋正秀、熱測定、29, 208-216(2003).
52. Experimental verification of the Stokes-Einstein-Smolchowski theory for a bimolecular diffusion-controlled reaction in liquid phase.
T.Arita, O.Kajimoto, M.Terazima, Y.Kimura, *J. Chem. Phys.*, 120, 7071-7074 (2004).
53. Submicron-Scale Photoluminescence of InGaN/GaN Probed by Confocal Scanning Laser Microscopy.
K.Okamoto, J.Choi, Y.Kawakami, M.Terazima, T.Mukai, S.Fujita, *Jpn.J.Appl. Phys.*, 43, 839-840(2004).
54. Kinetics of intermolecular interaction during protein folding of reduced cytochrome c.
S.Nishida, T.Nada, M.Terazima, *Biophys.J.*, 87, 2663-2675(2004).
55. A novel method for measurement of diffusion coefficients of proteins and DNA in solution.
N.Baden, M.Terazima, *Chem.Phys.Lett.*, 393, 539-545(2004).
56. The escape process of carbon monoxide from myoglobin to solution at physiological temperature.
Y.Nishihara, M.Sakakura, Y.Kimura, M.Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, 126, 11877-11888(2004).
57. Oscillation of refractive index at the focal region of a femtosecond laser pulse inside a glass.
M.Sakakura, M.Terazima, *Opt.Lett.*, 29, 1548-1550(2004).
58. Time-resolved detection of the Sensory Rhodopsin II-HtrII interaction.
K.Inoue, J.Sasaki, M. Morisaki, F.Tokunaga, M.Terazima, *Biophys.J.*, 87, 2587-2597(2004).

59. Dynamics of water soluble stilbene dendrimers upon photo-isomerization.
H.Tatewaki, N.Baden, A.Momotake, T.Arai, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 108, 12783-12789(2004).
60. Vibrational energy relaxation of naphthalene in the S_1 state in various gases.
Y. Kimura, D. Abe and M. Terazima, *J.Chem.Phys.*, 121, 5794-5800(2004).
61. 蛋白質の熱力学量ダイナミクス.
寺嶋正秀、パリティ, 01, 58-60(2004).
62. レーザー分光を用いた時間分解熱力学量解析による蛋白質-蛋白質相互作用のダイナミクス.
井上圭一、寺嶋正秀、京大低温物質科学研究センター誌, 4, 25-31(2004).
63. Time-resolved thermodynamic properties of intermediate species during photochemical reactions.
M. Terazima, *Bull.Chem.Soc.Jpn*, 77, 23-41, (2004).
64. Quantities, Terminology and Symbols in Photothermal and Related Spectroscopies.
M.Terazima, N.Hirota, S.E. Braslavsky, A.Mandelis, S.E.Bialkowski, G.J. Diebold, R. J. D. Miller, D. Fournier, R.A. Palmer, A.Tam
Pure and Applied Chemistry, 76, 1083-1118(2004).
65. Initial process of the refractive index change induced by tightly focused femtosecond laser inside a transparent material.
M.Sakakura, M.Terazima, *Proceedings of SPIE, High power laser ablation V*, 1069-1077(2004).
66. Acceptor number of room temperature ionic liquid determined by the Raman spectrum of diphenylcyclopropenone.
Y.Kimura, M.Fukuda, T.Fujisawa, M.Terazima, *Chem.Lett.*, 34, 338-339(2005).
67. Initial temporal and spatial changes of the refractive index induced by focused femtosecond pulsed laser irradiation inside a glass.
M.Sakakura, M.Terazima, *Phy.Rev.B*, 71, 024113, 1-12(2005).
68. Vibrational energy relaxation of azulene studied by the transient grating method. I. Supercritical fluids.
Y. Kimura, Y. Yamamoto, H. Fujiwara, M. Terazima, *J.Chem.Phys.*, 123, 054512 (1-13) (2005).
69. Vibrational energy relaxation of azulene studied by the transient grating method. II. Liquid solvents.
Y. Kimura, Y. Yamamoto, M. Terazima, *J.Chem.Phys.*, 123, 054513 (1-6) (2005).

70. Hydrogen bonding dynamics during protein folding of reduced cytochrome c: temperature and denaturant concentration dependence.
S.Nishida, T.Nada, M.Terazima, *Biophys.J.*, 89, 2004-2010(2005).
71. Conformational dynamics of Phototropin 2 LOV2 domain with the linker upon photoexcitation.
T.Eitoku, Y.Nakasone, D.Matsuoka, S.Tokutomi, M.Terazima, *J.Am. Chem.Soc.*, 127,13238-13244(2005).
72. Confocal micro-photoluminescence of InGaN-based light emitting diodes.
K.Okamoto, A.Kaneta, Y.Kawakami, S.Fujita, J.Choi, M.Terazima, T.Mukai, *J. Appl. Phys.*, 98, 064503(1-7) (2005).
73. A biosensor in time-domain based on the diffusion coefficient measurement: Intermolecular interaction of an intermediate of Photoactive Yellow Protein.
J.S.Khan, Y.Imamoto, Y.Yamazaki, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima, *Anal.Chem.*, 77, 6625-6629(2005).
74. Time-resolved enthalpy changes of Sensory Rhodopsin II and the transducer complex during photo-reaction.
K. Inoue, J. Sasaki, M. Morisaki, F. Tokunaga, and M. Terazima, *Journal de Physique IV*, 125, 769-772(2005).
75. 時間分解熱力学法が開く蛋白質反応ダイナミクスの全体像.
寺嶋正秀、現代化学, 32-38, 7月 2005 年
76. Photoacoustic and thermal grating investigations of charge stabilization in reaction center protein.
L.Nagy, H.Omori, S.Malkin, D.Márta, M. Terazima, *Proceedings of Forum Acusticum*, Budapest, 2005.
77. Real-Time Observation of Photothermal Effect After Photo-Irradiation of Femtosecond Laser Pulse Inside a Glass.
M.Sakakura, M.Terazima, *Journal de Physique IV*, 125, 355-360(2005).
78. Diffusion coefficient and the secondary structure of poly-L-glutamic acid in aqueous solution.
K.Inoue, N.Baden, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 109, 22623-22628(2005).
79. Time-resolved thermodynamics: Heat capacity change of transient species during photo-reaction of PYP
J.S.Khan, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*,
80. Diffusion coefficients as a monitor of reaction kinetics of biological molecules
M.Terazima, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 8,545-557(2006).

(b) 学会発表

1. M.Terazima, Time-Resolved Structural and Energy Changes of Proteins Detected by the Laser Induced Transient Grating
Photochemical Processes in Gas, Condensed Phases and Bio-system: Interplay between Experiments and Theories, Okazaki Conference Center, Jan.10, - Jan.12, 2001 (招待講演)
2. K. Okamoto, S. Saijo, Y. Kawakami, Sg. Fujita, M. Terazima, T. Mukai, G. Shinomiya, S. Nakamura, Direct Observation of the Nonradiative Recombination Processes in InGaN-based LEDs probed by the third-order Nonlinear Spectroscopy
SPIE Photonics West Optoelectronics 2001, San Jose, California, USA, Jan. 20-26, 2001
3. M. Terazima, Time-Resolved Structural and Energy Changes of Proteins Detected by the Laser Induced Transient Grating
International Conference on "Chemical Reaction Dynamics in Manybody Chemical Systems", Feb. 21-22, 2001
4. 西奥義憲、中川将司、津田基之、寺嶋正秀、タコロドプシン光反応におけるエンタルピー及び体積変化
日本化学会春季年会、神戸、2001年3月27-30日
5. J. Choi、寺嶋正秀、蛋白質の構造変化に伴う拡散定数の変化
日本化学会春季年会、神戸、2001年3月27-30日
6. 竹下寛、寺嶋正秀、三原憲一、今元泰、片岡幹雄、徳永史生、体積とエンタルピーの変化から見る光受容蛋白質 PYP の中間体構造ダイナミクス
日本化学会春季年会、神戸、2001年3月27-30日
7. 井上謙一、泉知明、岡本晃一、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀、辻村歩、木戸口勲、低転位 GaN 上 InGaN/GaN MQW における非輻射過程の評価
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001年3月
8. 岡本晃一、西條慎、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀、四宮源市、向井孝志、ピコ秒過渡回折格子法による InGaN 系 LED におけるキャリア・励起子の拡散過程の直接観測
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001年3月
9. 尾形健一、岡本 晃一、寺嶋 正秀、西條 慎、藤田静雄、藤田 茂夫、MOVPE 成長 ZnO の過渡グレーティング(TG)法による評価
応用物理学会学術講演会、明治大学、2001年3月
10. 坂倉政明、小西一誠、森島績、寺嶋正秀、過渡回折格子法を用いた MbCO の光解離過程における CO 放出の観測
生体分子科学討論会、金沢、2001年7月5-6日

11. 西奥義憲、中川将司、津田基之、寺嶋正秀、タコロドブシン光反応中間体エネルギー準位の時間分解測定
光生物学討論会、北海道、2001年6月28-29日
12. M. Terazima, Kinetics of biological intermediate species which cannot be detected by optical transition
IUPAC Congress and 41st IUPAC General assembly, Brisbane, Australia, 29 June to 8 July 2001
13. M. Terazima, A new technique to study protein dynamics: Energy and structural changes of photoreceptor proteins
Photobiology and energy conversion process, Nagoya, July 27-28, 2001
14. M. Terazima, Photophysical and photochemical dynamics of biological proteins from picosecond to millisecond studied by the laser-induced transient grating
XX International Conference on Photochemistry, Moscow, Russia, July 31 - August 3, 2001
15. 井上謙一、岡本晃一、川上養一、寺嶋正秀、藤田茂夫、辻村歩、木戸口勲、低転位 GaN 上 InGaN/GaN MQW における非輻射過程の評価(II)
第 62 回応用物理学会学術講演会、愛知工業大学、2001 年 9 月 11 日-14 日
16. M. Terazima, Protein dynamics monitored from the thermal energy releasing process by the time-resolved transient grating technique
5th Photoacoustic and Photothermal Phenomena Gordon Research Conference, Oxford, August 19-24, 2001
17. M. Terazima, Energy transfer processes from the electronic energy to the thermal energy in solution
5th Photoacoustic and Photothermal Phenomena Gordon Research Conference, Oxford, August 19-24, 2001
18. M. Terazima, Fast Photo-Heating Process Studied by Ultrashort Laser Induced Acoustic Wave
17th International Congress on Acoustics, Rome, Italy, Sep. 2-6, 2001 (招待講演)
19. 宮田涼司、寺嶋正秀、蛋白質の光励起エネルギー放出機構
分子構造討論会、北大、札幌、2001 年 9 月 24-27 日
20. 名田智一、寺嶋正秀、過渡回折格子法で観た蛋白質の折りたたみダイナミクス
分子構造討論会、北大、札幌、2001 年 9 月 24-27 日
21. 中山伊織、寺嶋正秀、気液界面における表面波のダイナミクス
分子構造討論会、北大、札幌、2001 年 9 月 24-27 日

22. 木村佳文、綱島裕之、寺嶋正秀
近対向過渡回折格子法による超臨界流体中の電荷移動錯体の光励起ダイナミクスの検討
分子構造討論会、北大、札幌、2001年9月24-27日
23. 大森努、木村佳文、廣田襄、寺嶋正秀
超臨界アルコール中におけるラジカル拡散定数の測定
分子構造討論会、北大、札幌、2001年9月24-27日
24. 寺嶋正秀、岡本晃一、野上唯、伊庭野大輔、富永敏弘、ラジカル拡散に対する水素結合の影響
溶液化学シンポジウム、岡山大学、2001年9月20日-22日
25. 寺嶋正秀、新しい時間分解分光法で観た溶液内分子ダイナミクス
溶液化学シンポジウム、岡山大学、9月20日-22日 (招待講演)
26. 竹下寛、三原憲一、今元泰、片岡幹雄、徳永史生、寺嶋正秀、光受容蛋白 PYP の構造とエネルギーダイナミクス
光化学討論会、金沢、2001年9月10-13日
27. J. Choi、寺嶋正秀、変性状態でのカルボキシミオグロビンの光解離反応のダイナミクス
光化学討論会、金沢、2001年9月10-13日
28. 宮田涼司、寺嶋正秀、電子励起エネルギーが熱に変換される速度：マラカイトグリーン
光化学討論会、金沢、2001年9月10-13日
29. 井上謙一、岡本晃一、川上養一、藤田茂夫、寺嶋正秀、低転移 GaN 上 InGaN/GaN MQW
における非輻射過程の評価 (II)
応用物理学会、2001年9月13日
30. 西奥義憲、中川将司、津田基之、寺嶋正秀、タコロドプシン光反応における中間体エネルギー準位の時間分解測定
日本生物物理学会年会、大阪、2001年10月6-8日
31. 坂倉政明、西原泰孝、木村佳文、寺嶋正秀、MbCO 光解離反応に対する Xe の影響と ligand pathway に関する研究
日本生物物理学会年会、大阪、2001年10月6-8日
32. M. Terazima, Time-resolved protein dynamics monitored by optical nonlinear spectroscopy
Japan America Frontier of Science, Tokyo, Oct. 9-12, 2001
33. 寺嶋正秀、非線形光学分光法で観る新しいエネルギーと分子ダイナミクス
分子工学コロキウム、京大工学部、2001年11月2日 (招待講演)

34. 寺嶋正秀
蛋白質の時間分解エネルギー・構造変化
生理研研究会「生体分子ダイナミクス及びプリオン機構研究会」、分子研、2002 年 2 月 6 日-8 日 (招待講演)
35. 寺嶋正秀、分子間相互作用と熱化過程および分子拡散
「化学反応現象に特徴的な非平衡非定常性の解明—現代化学からみた統計理論の再考—」公開シンポジウム、分子研、岡崎、2002 年 3 月 8 日-10 日
36. M.Terazima, Protein and Energy Dynamics of PYP Studied by Time-Resolved Laser Induced Transient Grating
Symposium of Advanced Spectroscopy on Photoactive Yellow Protein, Sendai, Japan, March 15-16, 2002 (招待講演)
37. 寺嶋正秀、帯刀洋、水谷拓雄、早川純平、新井達郎、スチルベンデンドリマーの光異性化反応に伴うエネルギーと構造変化
日本化学会春季年会、早稲田大学、2002 年 3 月 26-29 日
38. 西奥義憲、中川将司、津田基之、寺嶋正秀、過渡回折格子法によるタコロドプシンと G タンパク質との相互作用の研究
日本化学会春季年会、早稲田大学、2002 年 3 月 26-29 日
39. 寺嶋正秀、蛋白質の反応ダイナミクスと水分子
分子研研究会「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」、分子研、2002 年 5 月 14 日-16 日
40. 寺嶋正秀、分子科学と生体分子科学
分子科学研究会シンポジウム、岡崎市葵丘会館、2002 年 5 月 17 日-18 日
41. 岡本晃一、井上謙一、川上養一、藤田茂夫、崔正權、寺嶋正秀、辻村歩、木戸口勲、低転移 GaN の時間-空間分解光熱変換過程の観測
電子情報通信学会研究会、同志社大学 (京田辺キャンパス)、2002 年 6 月 13 日-14 日
42. M.Terazima, Photothermal processes on a fast time scale: small molecules and biological proteins
12th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Toronto, Canada, June 24-27 (2002) (招待講演)
43. K. Okamoto, K. Inoue, Y. Kawakami, S. Fujita, M. Terazima, A. Tsujimura, I. Kidoguchi, Nonradiative recombination processes of carriers in InGaN/GaN probed by the microscopic transient lens spectroscopy
12th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Toronto, Canada, June 24-27, 2002

44. M. Sakakura, M. Terazima, Studies on the femtosecond laser-induced refractive index change in a silicate glass by the transient lens method
12th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Toronto, Canada, June 24-27, 2002
45. J. Choi, M. Terazima, Energy and volume changes induced by photo-initiated proton releasing reaction with apomyoglobin
12th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Toronto, Canada, June 24-27, 2002
46. M. Terazima, Structural and energy changes of photo-reactive biological proteins studied by the time-resolved transient grating technique
Department seminar in University of Toronto, June 28, 2002
47. M. Terazima, Structural and Energy Dynamics of proteins Studied by Time-Resolved Thermodynamical Properties
First International Conference on Biomedical Spectroscopy: From Molecules to Men, Cardiff, Wales, United Kingdom, July 7-10, 2002 (招待講演)
48. M. Sakakura, M. Terazima, photo-dissociation reaction of carboxymyoglobin studied by the laser-induced transient grating: How does the ligand escape from the protein
IUPAC conference on photochemistry, Budapest, Hungary, July 14-19, 2002
49. M. Terazima, Is the diffusion of transient radicals anomalous?
Sixth Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes" Novosibirsk, Russia, July 21-25, 2002 (招待講演)
50. 寺嶋正秀、光反応蛋白質ダイナミクスの新しい時間分解検出法とその応用
横浜市立大セミナー、横浜、2002年9月6日
51. 寺嶋正秀、名田智一、光誘起蛋白質構造変化ダイナミクスの新しい追跡法
光化学討論会、京都、2002年9月11日-14日
52. 井上圭一、西奥義憲、寺嶋正秀、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、過渡回折格子法による Sensory rhodopsin II の光励起反応サイクルの研究
光化学討論会、京都、2002年9月11日-14日
53. 西田親平、名田智一、寺嶋正秀、過渡回折格子法で見たシトクロム c のフォールディングダイナミクス
光化学討論会、京都、2002年9月11日-14日

54. 岡本晃一、崔正權、川上養一、寺嶋正秀、向井孝志、藤田茂夫、共焦点レーザー顕微分
光法を用いた InGaN/GaN 系 LED のナノ空間分解発光特性
光化学討論会、京都、2002 年 9 月 11 日-14 日
55. 寺嶋正秀、新しい時間分解分光法で見る光受容蛋白ダイナミクス
京阪奈光生物物理学セミナー、京都、2002 年 9 月 14 日
56. 寺嶋正秀、名田智一、時間依存拡散係数の観測：蛋白質構造変化
溶液化学シンポジウム、大阪、2002 年 9 月 26 日-28 日
57. 木村佳文、山本義則、寺嶋正秀、
溶液中におけるアズレンの振動エネルギー緩和の研究 - 溶媒からのアプローチ -
溶液化学シンポジウム、大阪、2002 年 9 月 26 日-28 日
58. J. Shahbaz Khan、三原憲一、今元泰、片岡幹雄、徳永史生、寺嶋正秀、PYP の光反応構造
変化と蛋白-蛋白相互作用
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
59. J. Choi、廣田俊、秋山昌子、渡辺芳人、寺嶋正秀、過渡回折格子法を用いたアポプラスト
シアニンのフォールディング過程の研究
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
60. 坂倉政明、寺嶋正秀、サブピコ秒時間分解過渡レンズ法を用いたガラス内部におけるフ
ェムト秒レーザー誘起構造変化の研究
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
61. 木村 佳文、寺嶋 正秀
貴金属超微粒子コロイド分散系におけるエネルギー緩和の研究
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
62. 木村 佳文、山本 義則、寺嶋 正秀
過渡回折格子法によるアズレンのエネルギー緩和の研究
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
63. 大森努、木村佳文、寺嶋正秀、過渡回折格子法を用いた超臨界流体中での水素引き抜き
反応速度の測定
分子構造総合討論会、神戸、2002 年 10 月 1 日-4 日
64. 藤本ゆかり、廣田俊、片桐徳子、Choi Jungkwon、寺嶋正秀、高倍昭洋、渡辺芳人
光解離性修飾基を用いたプラストシアニンの折りたたみ反応の研究
日本生物物理学会年会、名古屋、2002 年 11 月 2-4 日

65. 寺嶋正秀、Choi Jungkwon、廣田俊、藤本ゆかり、片桐徳子、渡辺芳人、高倍昭洋
過渡回折格子法で見るアポプラスチアニンの折り畳みダイナミクス
日本生物物理学会年会、名古屋、2002年11月2-4日
66. 森崎雅代、西奥義憲、井上圭一、佐々木純、寺嶋正秀、徳永史生、ファラオニスセンサ
リーロドプシンII及びトランスデューサー複合体の過渡回折格子法測定
日本生物物理学会年会、名古屋、2002年11月2-4日
67. 西原泰孝、坂倉政明、木村佳文、寺嶋正秀、カルボキシミオグロビンのリガンド放出過
程
日本生物物理学会年会、名古屋、2002年11月2-4日
68. 寺嶋正秀、拡散検出バイオセンサー
公開技術診断-特許技術ビジネスマッチングフォーラム、大阪、2002年10月29日
69. 寺嶋正秀、新しい量で観る蛋白質ダイナミクス
分子研研究会「複雑凝集系の分子科学」、岡崎、2002年11月8-10日（招待講演）
70. M.Terazima, New Time-resolved Detections on Energy and Protein Structures of Some
Photoactive Proteins
Dynamical Structures and molecular design of metalloproteins, Okazaki, Japan, Nov. 18-21, 2002（招
待講演）
71. M.Terazima, New techniques to detect energy and conformational changes of proteins
The 10th Anniversary RIES-Hokudai International Symposium, Sapporo, Japan, Dec. 9-11, 2002
（招待講演）
72. M. Terazima, Protein dynamics studied by new time-resolved method
Indo - Japan symposium on Structure and Dynamics of Complex Molecular Systems: From a
Molecule to a Living Cell, The University of Tokyo, Japan, January 28- 29, 2003（招待講演）
73. 寺嶋正秀、新しい時間分解熱力学量計測による蛋白質反応ダイナミクス
理工学研究所研究会、立命館大学、2003年3月1日（招待講演）
74. 寺嶋正秀、実験と計算による時間分解蛋白質ダイナミクスの解明へ
スーパーコンピュータワークショップ、分子研、2003年3月11日-12日（招待講演）
75. 片桐徳子、藤本ゆかり、廣田俊、Choi Jungkwon、寺嶋正秀、高倍昭洋、渡辺芳人、舟崎、
光解離性修飾基を用いたプラスチアニンの折り畳み反応
日本化学会春季年会、早稲田大学、2003年3月18日-21日

76. 井上圭一、西奥義憲、寺嶋正秀、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、センサリーロドプシンⅡおよびトランスデュサー複合体の光反応サイクルにおける動的挙動の研究
日本化学会春季年会、早稲田大学、2003年3月18日-21日
77. 西田親平、名田智一、寺嶋正秀、拡散係数から見るチトクロムcのフォールディング過程
日本化学会春季年会、早稲田大学、2003年3月18日-21日
78. 帯刀洋、寺嶋正秀、水谷拓雄、早川純平、新井達郎、光異性化デンドリマーのエネルギーと構造変化
日本化学会春季年会、早稲田大学、2003年3月18日-21日
79. 寺嶋正秀、時間分解熱力学量および時間分解輸送現象測定手法の開発と化学反応への展開
日本化学会春季年会、早稲田大学、2003年3月18日-21日（受賞講演）
80. 寺嶋正秀、ロドプシンのエネルギーと構造ダイナミクス
分子科学研究所研究会「ロドプシンの分子科学」、岡崎コンファレンスセンター、2003年5月30日-5月31日（招待講演）
81. M.Terazima, A novel method to study structural and energy dynamics of proteins from a view point of time-resolved thermodynamics
Canadian Association of Physicists, Prince Edward Island, Canada, June 8 - 11, 2003（招待講演）
82. M. Terazima, Initial step of the photothermal effect in solution and in glass
2003 Gordon Research Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, New London, U.S.A., June 8-13, 2003（招待講演）
83. 寺嶋正秀、生体蛋白質における振動エネルギー緩和
分子研研究会「単純系から複雑系にわたる凝集系振動緩和ダイナミックス 研究の現状と将来」、岡崎コンファレンスセンター、2003年6月24日-26日（招待講演）
84. 西原泰孝、坂倉政明、木村佳文、寺嶋正秀、カルボキシミオグロビンのリガンド放出過程
第30回生体分子科学討論会、京都、2003年6月28日-29日
85. Javaid Shahbaz Khan、三原憲一、今元素、片岡幹雄、徳永史生、寺嶋正秀、PYPの光反応構造変化と蛋白-蛋白相互作用
第30回生体分子科学討論会、京都、2003年6月28日-29日
86. 寺嶋正秀、蛋白質の水素結合をどのように検出するか
分子研研究会「生体関連分子の水素結合とダイナミクスの新展開」、岡崎コンファレンスセンター、2003年7月11日-12日（招待講演）

87. S.Hirota, Y.Fujimoto, H.Okumura, N.Katagiri, J.Choi, M.Terazima, S. Arie, K.Tanaka, M.Shionoya, T.Okajima, N. Funasaki, Y.Watanabe, Structural Change of Plastocyanin. Molecular Interaction and Protein Folding
11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Cairns, Australia, July 19 - 23, 2003
88. M. Terazima, Time-resolved studied of thermodynamical properties of photo-reactive proteins
International Conference on Photochemistry, Nara, Japan , July 26 to 31, 2003 (招待講演)
89. 井上圭一、西奥義憲、寺嶋正秀、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、センサリーロドプシン II およびトランスデューサー複合体の光反応サイクルにおける動的挙動の研究
第 10 回日本光生物学協会講演会、奈良女子大、2003 年 7 月 4 日 - 5 日
90. M. Terazima, A new type of a biosensor
Second International Conference on Biomedical Spectroscopy, London, UK , 5-8 July, 2003 (招待講演)
91. M.Sakakura, M.Terazima, GHz oscillation of refractive index induced by focused femtosecondlaser pulse inside a glass
International Conference on Photochemistry, Nara, Japan, July 26-31, 2003
92. M. Terazima, Time-resolved studied of thermodynamical properties of photo-reactive proteins
International Conference on Photochemistry, Nara, Japan, July 26-31, 2003 (招待講演)
93. Y. Kimura, Y. Yamamoto, M. Terazima, Vibrational energy relaxation of azulene in fluids studied by the transient grating method
International Conference on Photochemistry, Nara, Japan, July 26-31, 2003
94. M. Nishiyama, T. Watanabe, A. Iwane, T. Wazawa, Y. Ishii, T. Yanagida, M. Terazima, Temperature dependence of sliding movement of single molecular motors
International Conference on Photochemistry, Nara, Japan, July 26-31, 2003
95. 寺嶋正秀、望ましい教育研究基盤
教育研究基盤整備の新国際水準パラダイム構築に関する研究会、岡崎コンファレンスセンター、2003 年 8 月 1 日
96. M. Terazima, A new time-resolved spectroscopy to detect protein reaction dynamics
13th international symposium "Spectroscopy in theory and practice" Nova Gorica, Slovenia, August 27 - 30, 2003 (Plenary lecture)
97. M. Terazima, Time-resolved transport properties of transient species
University seminar of Nova Gorica Polytechnic, Slovenia, Sept. 1, 2003 (招待講演)

98. M. Terazima, New technique to detect energy and conformational changes of proteins in time-domain
226th National Meeting of American Chemical Society, New York, USA, September 7-11, 2003 (招待講演)
99. 坂倉政明、寺嶋正秀、密度空間分布の時間分解観測によるフェムト秒レーザー誘起ガラス構造変化過程
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
100. 木村佳文、寺嶋正秀、過渡回折格子法で見た溶媒和電子のエネルギーダイナミクス
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
101. 帯刀洋、百武篤也、新井達郎、寺嶋正秀、水溶性光異性化デンドリマーのエネルギーと構造変化
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
102. 永徳丈、X.Zarate、G.V.Kozhukh、J-I.Kim、P-S.Song、寺嶋正秀、過渡回折格子法で見たPhytochromeAの光反応構造変化
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
103. 井上圭一、西奥義憲、寺嶋正秀、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、過渡回折格子法で観る光受容センサリーロドプシンの蛋白質ダイナミクス
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
104. 西山雅祥、寺嶋正秀、生体分子モーターの1分子計測と動作メカニズム
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
105. 山本義則、木村佳文、寺嶋正秀、過渡回折格子法を用いた超臨界流体中におけるアズレンの振動緩和過程の研究
分子構造総合討論会、京都、2003年9月24日-27日
106. M. Terazima, Biological reactions of proteins in time-domain
KAIST seminar, Daejeon, Korea, Nov. 10-11, 2003
107. M. Terazima, A new way to detect time-resolved dynamics in protein reactions
“Frontier of Advanced Molecular Science:Spectroscopy of Ultra-Resolution in Time, Space and Energy“, Wako, Japan, Nov. 19-21, 2003 (招待講演)
108. 馬殿直樹、寺嶋正秀、過渡回折格子法による蛋白質拡散測定法
光化学討論会、松江、2003年11月22日-24日

109. 西田親平、名田智一、寺嶋正秀、拡散係数の時間変化で見たシトクロム c の折りたたみダイナミクス
光化学討論会、松江、2003 年 11 月 22 日-24 日
110. 大森寛子、Laszlo Nagi、寺嶋正秀、ヘテロダイン過渡回折格子法による光合成反応中心タンパク質の光反応ダイナミクス
光化学討論会、松江、2003 年 11 月 22 日-24 日
111. M. Terazima, Protein folding dynamics monitored by protein diffusion in real time
The 9th Keihanna Conference on Molecular Biophysics "Physical aspects of protein folding and function", Keihanna Plaza, Japan, Jan. 5-8, 2004 (招待講演)
112. 寺嶋正秀、蛋白質構造ダイナミクスを見る新しいレーザー分光
レーザー学会第 24 回年次大会、仙台国際センタ、2004 年 1 月 29-30 日 (招待講演)
113. 寺嶋正秀、時間分解で見る蛋白質反応のエネルギーと構造ダイナミクス
NAREGI ナノサイエンス実証研究第 2 回公開シンポジウム、岡崎コンファレンスセンター、2004 年 2 月 23 日-24 日 (招待講演)
114. 寺嶋正秀、溶液中におけるエネルギー変換過程
日本化学会第 84 春季年会 BCSJ 受賞講演、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日 (招待講演)
115. 寺嶋正秀、生体分子光化学の新展開
日本化学会第 84 春季年会、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日 (オーガナイザー)
116. 井上圭一、西奥義憲、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、寺嶋正秀、センサリーロドプシン II とトランスデューサーとの相互作用ステップ
日本化学会第 84 春季年会、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日
117. 馬殿直樹、寺嶋正秀、タンパク質構造の変性と拡散係数
日本化学会第 84 春季年会、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日
118. 永徳丈、中曽根祐介、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、Phototropin LOV2 domain 周りの光反応構造変化ダイナミクス
日本化学会第 84 春季年会、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日
119. 福田将典、木村佳文、寺嶋正秀、過渡回折格子法によるイオン性液体中の光解離反応の研究
日本化学会第 84 春季年会、関西学院大学、2004 年 3 月 26 日-29 日

120. M. Sakakura, M. Terazima, Initial process of the refractive index change induced by tightly focused femtosecond laser inside a transparent material.
International Conference on High-Power Laser Ablation, Taos, New Mexico USA, 25-30 April, 2004
121. T. Eitoku, X. Zarate, G. V. Kozhukh, J.-Il Kim, P.-S. Song, M. Terazima, Photoisomerization of phytochrome A studied by transient grating method
58th Yamada Conference Light sensing and signal transduction in plant photomorphogenesis, Okazaki, Japan, June 5-9, 2004
122. Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima, Structural dynamics of phototropin-LOV2 domain from Arabidopsis studied by the transient grating method.
58th Yamada Conference Light sensing and signal transduction in plant photomorphogenesis, Okazaki, Japan, June 5-9, 2004
123. M. Terazima, T. Eitoku, Xristo Zarate, Gennady V. Kozhukh, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, Time-resolved conformational change of phytochrome detected by the diffusion coefficient
14th International Congress on Photobiology, Jeju, Korea, June 10-15, 2004 (招待講演)
124. T. Eitoku, Y. Nakasone, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima, Photoinduced conformation dynamics around LOV2 domain of phototropin
14th International Congress on Photobiology, Jeju, Korea, June 10-15, 2004
125. M. Sakakura, M. Terazima, Real-time observation of photothermal effect after photo-irradiation of femtosecond laser pulse inside a glass
13th International conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Rio de Janeiro, Brazil, July 5-8, 2004 (招待講演)
126. K. Inoue, J. Sasaki, M. Terazima
Photothermal detection of protein-protein interactions: sensory Rhodopsin II-transducer interaction
13th International conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Rio de Janeiro, Brazil, July 5-8, 2004
127. S. Nishida, M. Terazima, A Novel Method for Study of Photo-induced Protein Folding Kinetics by the Time-Resolved Transient Grating Method
XX IUPAC Symposium on Photochemistry, Granada, Spain, July 17 - 22, 2004
128. Y. Kimura, Y. Yamamoto, M. Terazima, Photo-thermalization dynamics of azulene in supercritical fluids studied by the transient grating method
Ultrafast Phenomena, Niigata, Japan, July 25-30, 2004
129. 永徳 丈, Xristo Zarate, Gennady V. Kozhukh, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, 寺嶋 正秀、拡散係数変化から見た Phytochrome の光反応構造変化
分子構造総合討論会、広島、2004 年 9 月 27-30 日

130. 井上圭一、岩谷健二郎、馬殿直樹、寺嶋正秀、分子拡散測定によるポリペプチド鎖の二次構造変化の研究
分子構造総合討論会、広島、2004年9月27-30日
131. 馬殿直樹、寺嶋正秀、拡散係数変化から見たタンパク質構造変化
分子構造総合討論会、広島、2004年9月27-30日
132. 坂倉政明、寺嶋正秀、ガラス内部でのフェムト秒レーザー誘起構造変化のリアルタイム観測
分子構造総合討論会、広島、2004年9月27-30日
133. 井上圭一、西奥義憲、森崎雅世、佐々木純、徳永史生、寺嶋正秀、センサリーロドプシンII-トランスデューサー蛋白質複合体の光反応ダイナミクス
分子構造総合討論会、広島、2004年9月27-30日
134. 福田将典、木村佳文、寺嶋正秀、イオン液体中での拡散ダイナミクスに関する研究
分子構造総合討論会、広島、2004年9月27-30日
135. 井上圭一、馬殿直樹、寺嶋正秀、蛋白質及びポリペプチドの構造と分子拡散
溶液化学シンポジウム、東京電機大学、2004年11月19日-21日
136. 藤澤知績、福田将典、木村佳文、寺嶋正秀、blueプローブによるイオン液体の溶媒効果の検討
溶液化学シンポジウム、東京電機大学、2004年11月19日-21日
137. 福田将典、木村佳文、寺嶋正秀、イオン液体中の並進拡散ダイナミクスの特異性に関する研究
溶液化学シンポジウム、東京電機大学、2004年11月19日-21日
138. 中曽根祐介、永徳丈、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、過渡回折格子法で見たPhototropin-LOV2ドメイン周りの光反応構造変化ダイナミクス
光化学討論会、つくば市、2004年11月1日-3日
139. 馬殿直樹、廣田俊、寺嶋正秀、過渡回折格子法でみる光解離性修飾アポプラストシアニンの折れたたみ過程
光化学討論会、つくば市、2004年11月1日-3日
140. 寺嶋正秀、時間分解蛋白質反応ダイナミクスと水分子
生物物理年会、国立京都国際会館、2004年12月13日-15日（招待講演）

141. 永徳丈、中曽根祐介、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、青色光センサー蛋白質 Phototropin LOV
ドメイン付近の光反応構造変化
生物物理年会、国立京都国際会館、2004 年 12 月 13 日-15 日

142. 西山雅祥、木村佳文、寺嶋正秀、高圧蛍光顕微鏡の開発
生物物理年会、国立京都国際会館、2004 年 12 月 13 日-15 日

143. 井上圭一、松本久美、津田基之、寺嶋正秀、タコロドプシンの反応ダイナミクスの研究
生物物理年会、国立京都国際会館、2004 年 12 月 13 日-15 日

144. 寺嶋正秀、生体蛋白質の反応と構造ダイナミクスの新しい検出法
日本放射線影響学会、長崎ブリックホール、2004 年 11 月 25 日-27 日 (招待講演)

2005-2007

145. 寺嶋正秀、生体蛋白質の構造変化ダイナミクスを探る新手法
生体分光学と分子イメージングの最前線、岡崎コンファレンスセンター、2005 年 1 月 16-17
日 (招待講演)

146. 寺嶋正秀、生体蛋白質ダイナミクスの新しい観測法
奈良先端大学院大学セミナー、2005 年 1 月 12 日

147. M. Terazima, Dynamics of protein-protein interaction of photo-response proteins studied by laser
induced transient grating
The 4th Asian Photochemistry Conference, Taipei, Jan. 5 - 12, 2005 (招待講演)

148. M. Terazima, Time-resolved detection of conformation changes of photo-response proteins in
solution
Workshop of Water and Biomolecules, Tokyo, Japan, March 17-18, 2005. (招待講演)

149. K.Inoue, K.Matsumoto, M.Tsuda, M.Terazima, Study on back photo-reaction dynamics of
octopus Rhodopsin
Workshop of Water and Biomolecules, Tokyo, Japan, March 17-18, 2005

150. T. Eitoku, Xristo Zarate, G. V. Kozhukh, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, M. Terazima,
Conformation and intermolecular dynamics of Phytochrome after photoexcitation
Workshop of Water and Biomolecules, Tokyo, Japan, March 17-18, 2005

151. N. Baden, M. Terazima, pH-denaturation of myoglobin characterized by a new method for
measurement of protein diffusion-coefficient
Workshop of Water and Biomolecules, Tokyo, Japan, March 17-18, 2005

152. 井上圭一、松本久美、津田基之、寺嶋正秀、タコロドプシンの逆光反応ダイナミクスの研究
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
153. 馬殿直樹、井上圭一、寺嶋正秀、新しいタンパク質拡散係数測定法によるタンパク質変性過程の特徴づけ
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
154. 永徳丈、中曽根祐介、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、青色光センサー蛋白質 Phototropin LOVドメイン付近の構造変化ダイナミクス
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
155. 大森寛子、Nagi, Laszlo、寺嶋正秀、ヘテロダイン過渡回折格子法による光合成反応中心の光反応ダイナミクス
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
156. 藤澤知績、福田将典、木村佳文、寺嶋正秀、ラマン分光法によるイオン液体の溶媒効果の検討
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
157. 木村佳文、藤原洋規、寺嶋正秀、超臨界二酸化炭素中におけるアズレンの振動緩和過程
日本化学会第85春季年会、神奈川大学、2005年3月26日-29日
158. M. Terazima, Protein volume change and volume fluctuation measurements of transient species without pressure change
RIKEN Symposium Pressure and Protein Dynamics, RIKEN Harima Institute, Japan, March 30-31, 2005 (招待講演)
159. 井上圭一、寺嶋正秀、レチナールタンパク質のエネルギーと構造変化を観る
分子研研究会 ロドプシンの仲間・G蛋白質共役型レセプターの機能と構造、2005年6月15日-17日 (招待講演)
160. M. Terazima, Time-resolved study of refractive index change after irradiation of ultra-short laser pulse inside glasses
Canadian Association of Physicists Congress, Vancouver, Canada, June 5 - 8, 2005 (招待講演)
161. M. Terazima, Time-resolved thermodynamic properties of unstable intermediate species
Thermodynamics 2005, Sesimbra, Portugal, 6-8 April 2005
162. M. Terazima, Initial step of the photothermal effect in solution
Gordon Research Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Trieste, Italia, June 26 - July 1, 2005 (招待講演)

163. L. Nagy, H. Omori, S. Malkin, M. Terazima, Photoacoustic and thermal grating investigations of charge stabilization in reaction center protein
Forum acousticum, Budapest, Hungary, Aug. 29-Sept. 2, 2005 (招待講演)
164. 寺嶋正秀、光反応と生体蛋白質の機能ダイナミクス
第27回光化学若手の会、東京、2005年6月17-19日 (特別講演)
165. M. Terazima, Spectrally silent dynamics in a biological protein reaction: Conformational change of Phototropin
XXII International Conference on Photochemistry, Cairns, July, 24 - 29, 2005
166. 永徳 丈, Xristo Zarate, Gennady V. Kozhukh, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, 寺嶋 正秀、
過渡回折格子法で見た植物赤色光センサーPhytochromeの光反応構造変化
光生物協会年会、京都、2005年8月5日-6日
167. 寺嶋正秀、時間分解熱力学量からミオグロビンのリガンド解離の何が見えるか
研究会「分子系の構造と電子状態」、理研播磨、2005年9月7日-9日 (招待講演)
168. 中曽根祐介、永徳丈、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、光センサー蛋白質 Phototropin-LOV2
ドメイン周りの反応ダイナミクス
光化学討論会、福岡、2005年9月12日-14日
169. P. Hazra, K. Inoue, W. Laan, K. J. Hellingwerf, and M. Terazima, Conformational dynamics and
the signaling process of a photoreceptor protein for DNA transcription control
光化学討論会、福岡、2005年9月12日-14日
170. 馬殿直樹, Choi Jung Kong, 廣田俊, 寺嶋正秀、光解離性修飾基を用いたアポプラスト
シアニンのフォールディング反応の追跡
光化学討論会、福岡、2005年9月12日-14日
171. 井上圭一、久保恵美、出村誠、加茂直樹、寺嶋正秀、ハロロドプシンの光反応ダイナミ
クス
光化学討論会、福岡、2005年9月12日-14日
172. 藤澤知績, 木村佳文, 寺嶋正秀、共鳴ラマン分光法による高温高圧水の溶媒和に関する
研究
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
173. Khan Javaid Shahbaz, 今元泰、片岡幹雄、徳永史生、寺嶋正秀、時間分解熱力学 : PYP
反応中間体の熱容量
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日

174. 白石千晶、寺嶋正秀、Margaret Ahmad、過渡回折格子法でみる青色光受容蛋白質クリプトクロムの光反応
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
175. 井上圭一、久保恵美、出村誠、加茂直樹、寺嶋正秀、ハロロドプシンの光反応ダイナミクスの研究
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
176. 永徳丈、Xristo Zarate, Gennady V. Kozhukh, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, 寺嶋正秀、植物赤色光センサーPhytochromeの光反応構造変化
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
177. 馬殿直樹、寺嶋正秀、拡散係数から見たアポミオグロビンの酸変性
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
178. 近藤正人、馬殿直樹、寺嶋正秀、過渡回折格子法を用いたカルモジュリン構造変化ダイナミクスの研究
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
179. 長尾智史、木村佳文、寺嶋正秀、光カーゲート法による超臨界流体中での時間分解蛍光観測システムの開発
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
180. 福田将典、木村佳文、梶本興亜、寺嶋正秀、過渡回折格子法によるジメチルニトロアニリンのエネルギー散逸過程に関する研究
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
181. 小山ふみ、谷本能文、井上克也、寺嶋正秀、光反応を用いた溶液の熱対流の強磁場効果
分子構造総合討論会、東京、2005年9月27日-30日
182. M. Terazima, A Novel Method for Study of Protein Reactions in Time Domain by the Transient Grating Method
HSC Houston for the Center for Membrane Biology/Biochemistry and Molecular Biology Seminar Series, The University of Texas, USA, Sep. 21, 2005. (招待講演)
183. 寺嶋正秀、隠された生体分子光反応ダイナミクスの本質を見る
物理化学コロキウム、仙台、2005年9月24-25日
184. 馬殿直樹、寺嶋正秀、蛋白質構造と分子拡散
第28回溶液化学シンポジウム、京都、2005年11月17日-19日

185. 藤澤知績, 木村佳文, 寺嶋正秀, 共鳴ラマン分光法による水素結合性超臨界流体中での溶媒和に関する研究

第 28 回溶液化学シンポジウム、京都、2005 年 11 月 17 日-19 日

186. 福田将典, 木村佳文, 梶本興亜, 寺嶋正秀, p-ニトロアニリン系化合物の振動緩和ダイナミクスに関する研究

第 28 回溶液化学シンポジウム、京都、2005 年 11 月 17 日-19 日

187. 寺嶋正秀, スペクトルで見えない蛋白質ダイナミクスを時間分解で観る
生物物理年会、北海道、2005 年 11 月 23 日-25 日 (招待講演)

188. 馬殿直樹, 寺嶋正秀, アポミオグロビンの酸変性過程における蛋白質溶媒相互作用
生物物理年会、北海道、2005 年 11 月 23 日-25 日

189. Javaid Shahbaz Khan, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, M. Terazima, Heat capacity change of transient species during photo-reaction of PYP

生物物理年会、北海道、2005 年 11 月 23 日-25 日

190. 西山雅祥, 木村佳文, 西山嘉男, 寺嶋正秀, 高圧下にあるキネシン-微小管系の顕微解析

生物物理年会、北海道、2005 年 11 月 23 日-25 日

191. 井上圭一, 佐々木純, 寺嶋正秀, センサリーロドプシン IID75N 変異体とトランスデュースータンパク質の相互作用ダイナミクスの研究

生物物理年会、北海道、2005 年 11 月 23 日-25 日

192. 寺嶋正秀, 生体分子反応における構造とエネルギー変化ダイナミクス

第 19 回分子シミュレーション討論会、岡崎、2005 年 11 月 29 日-12 月 1 日 (招待講演)

193. S.Hirota, K.Azuma, N.Baden, R.Hulsker, M.Ubbink, N. Funasaki, M.Terazima, Folding of Apoplastocyanin Studied by Photo-Cleavable Modification

194. M. Terazima, Intermolecular Interaction between solvent molecules and charged species on energy and molecular dynamics

Pacificchem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005. (招待講演)

195. M. Terazima, Time-resolved studies of intermolecular interaction between protein and water

Pacificchem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005. (招待講演)

196. Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima, Conformational dynamics of phototropin1-LOV2 domain with the linker part upon photoexcitation

Pacificchem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005

197. K. Inoue, M. Demura, N. Kamo, M. Terazima, Spectrally silent conformational change of halorhodopsin
Pacifichem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005
198. T. Eitoku, X. Zarate, G. V. Kozhukh, J. -I. Kim, P.-S. Song, M. Terazima, Conformation change of Phytochrome A studied by Transient Grating method
Pacifichem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005
199. N. Baden, M. Terazima, Conformational changes of myoglobins studied by the diffusion coefficient
Pacifichem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005
200. T. Fujisawa, Y. Kimura, M. Terazima, Development and application of a multi-purpose optical flow cell for supercritical water.
Pacifichem, Honolulu, USA, Dec.15-21, 2005
201. N. Baden, M. Terazima, Conformational change of apomyoglobin at various pH from a viewpoint of the interaction with water; diffusion coefficient
The 3rd Open Workshop for Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules, Okazaki, Japan, Jan.6-7, 2006
202. 寺嶋正秀、イオン液体中での光化学反応
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日
203. 木村佳文、福田将典、寺嶋正秀、過渡回析格子法によるイオン液体中の光化学反応の研究
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日 (招待講演)
204. 熊崎茂一、長谷川慎、谷口太郎、Ghoneim, Mohamed、池上勇、西山雅祥、寺嶋正秀、大岡宏造、顕微蛍光スペクトル画像法による葉緑体微細構造の環境順応ダイナミクス
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日
205. 福田将典、木村佳文、梶本興亜、寺嶋正秀、マラカイトグリーン の光励起にともなうイオン液体の緩和過程に関する研究
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日
206. 星原悠司・今元泰・片岡幹雄・徳永史生・木村佳文・寺嶋正秀、Photoactive Yellow Protein の時間分解構造揺らぎ検出
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日
207. 藤澤知績、木村佳文、寺嶋正秀、N,N-ジメチル-p-ニトロアニリンのラマンストークスシフトの励起波長依存性
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日 - 30 日

井上圭一、佐々木純、Spudich, John、寺嶋正秀、センサリーロドプシン II とトランスデューサタンパク質の相互作用ダイナミクス：D75N 変異体
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

208. 永徳丈、中曽根祐介、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、Phototropin の光サイクル反応における体積・エンタルピー変化
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

209. 中曽根祐介、永徳丈、松岡大介、徳富哲、寺嶋正秀、青色光受容体フォトトロピン 1 LOV2 ドメインの光誘起構造変化
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

210. Hazra, Partha、井上圭一、Laan, Wouter、Hellingwerf, Klass J.、寺嶋正秀、Excited State Photochemistry of a Photoreceptor Protein AppA Monitored by Diffusion Change
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

211. 馬殿直樹、寺嶋正秀、拡散係数から見た、ミオグロビンの酸変性過程における蛋白質溶媒間相互作用
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

212. 藤澤知績、木村佳文、寺嶋正秀、超臨界水中での共鳴ラマン分光による溶媒和の研究
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

213. 近藤正人、馬殿直樹、寺嶋正秀、カルシウムイオンとカルモジュリンの結合による構造変化ダイナミクス検出の試み
日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006 年 3 月 27 日－30 日

4-5、暗い中間体観測手法の開発

(a) 時間分解エンタルピー・体積変化

科学の分野において、物質の性質と反応は基本的な根幹である。18世紀より熱力学量の測定法と理論体系が作られ、膨大なデータと共に物質の理解に大きな役割を果たしている。実際、水や蛋白質の構造・性質を知る上で、熱力学量は重要な物理量として用いられてきた。一方で、レーザー分光法を用いた速度論は様々なダイナミクスを明らかにし、その分子論的機構を解明するために強力な手法としてその地位を確立している。このように反応のダイナミクス解明と熱力学量の測定は、化学における両輪の役目を果たしているが、これまでこれらの2つの分野は関連が少なかった。すなわち、熱力学量は定常状態で測られる量であり、その非平衡状態での時間発展や短寿命中間体に対して適用する手法がなかったし、また熱力学量から見たダイナミクスという概念はなかった。(図1) ダイナミクスと熱力学から得られる情報を統合することによって、化学反応の理解はより深まるであろう。

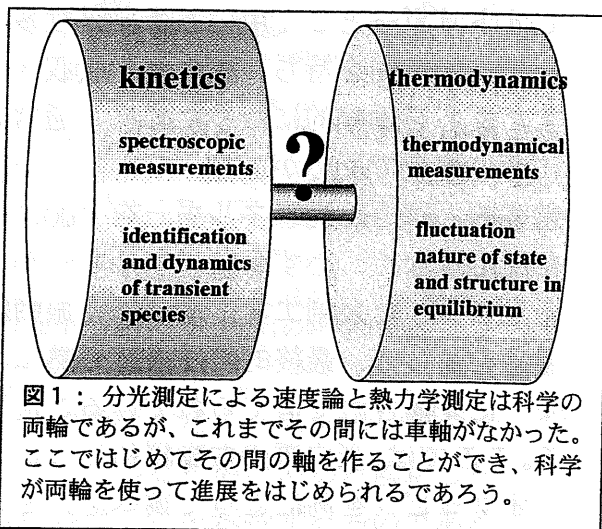


図1：分光測定による速度論と熱力学測定は科学の両輪であるが、これまでその間には車軸がなかった。ここではじめてその間の軸を作ることができ、科学が両輪を使って進展をはじめられるであろう。

こうした速度論と熱力学を融合する試みの一つが、光励起した後に観測される音波を捉える、光音響法である。しかし、こ

の手法では熱による信号と体積変化による信号が混ざって観測され、それらを分離するためにはいくつかの仮定を設ける必要があり、真に熱力学量を測定したものではなかった。また、観測できる時間窓もナノ秒からマイクロ秒とかなり狭いものであり、両者を融合するものではなかった。こうした背景のもと、本研究では過渡回折格子法を用いて、これらの欠点を一気に解決する方法を提出することができた。これにより、従来は時間発展と言う観点で考えられたことのなかった物理量、特に熱力学量を時間分解することを可能にし、初めて光化学反応のエンタルピーや分子体積変化、熱膨張係数変化を時間分解測定することに成功し、以下に示すような多くの成果を挙げることができた。

(b) 高速エネルギー緩和過程

光励起状態がよりエネルギーの低い状態へ無輻射遷移を起こすとき、そのエネルギーは溶媒へ受け渡される。これは光熱現象と知られているが、分子科学の分野では光励起された分子に着目して振動緩和と呼ばれ、長く理論的・実験的研究が行われてきている。こうしたエネルギー変換の初期過程を調べる場合、光励起された分子の高振動状態の冷却過程を観測するのが普通であった。一方で、そのエネルギーが流れていく先である溶媒の熱エネルギーがどのように上昇しているのかを観測できる実験手法がなかったため、発熱の初期過程の機構解明という点については片手落ちの状態が続いていた。本研究の一つの目標が、超高速熱検出法の開発であった。いくつかの新

しい手法を開発することで、温度上昇をピコ秒の時間分解能で捕らえることに成功した。この手法を用いて、光励起された比較的小さい有機分子（例えばマラカイトグリーンやアズレン）の励起状態からの無輻射遷移後にどのように溶媒にエネルギーが受け渡されるかという、エネルギー変換過程の素過程を明らかにすることに成功した。その結果、水素結合や静電的な相互作用によって、溶質分子と溶媒分子の分子間相互作用が強くなるに従って速く移動すること、その際には再近接溶媒分子のうち数個がエネルギーの受け渡しに関係していることなど、多くのことが明らかとなった。

また、この手法を蛋白質のエネルギー状態を明らかにするために用いた。光エネルギーを、生体エネルギーや情報伝達のためのエネルギー、あるいは化学反応を引き起こすトリガーとして用いる蛋白質は多い。こうした蛋白質では太陽光を効率的に使うために発色団を持ち、可視光を吸収する。

また反応を効率的に行うために、通常非常に速い速度で反応が進む。しかし、いかに効率的とはいえ光エネルギーを 100%使った反応はなく、必ず余剰エネルギーができる。こうした余剰エネルギーは、振動緩和過程を通して、最終的には溶媒の熱エネルギーに変換されて捨てられていることになる。ここでは、蛋白質の振動緩和について、ミオグロビンを例にとって調べた。ミオグロビンの内部にある発色団のヘムには、酸素や一酸化炭素などの気体分子が結合する

が、このヘムの励起状態ダイナミクスを含め、エネルギーの流れる経路や速度について早くから研究が行われてきたが、光吸収をしたヘム発色団から蛋白質にエネルギーが流れてから溶媒へ行くのか、直接溶媒へ受け渡されるのかなど基本的な経路については全く不明であった。経路についての実験的知見を得るため、ここでは過渡回折格子法を用い、音響信号を調べることで、発色団から蛋白質へエネルギーが流れ、蛋白質部分が熱膨張を起こしていることを発見した（図2）。こうした結果から、蛋白質の振動緩和過程を明らかにした。

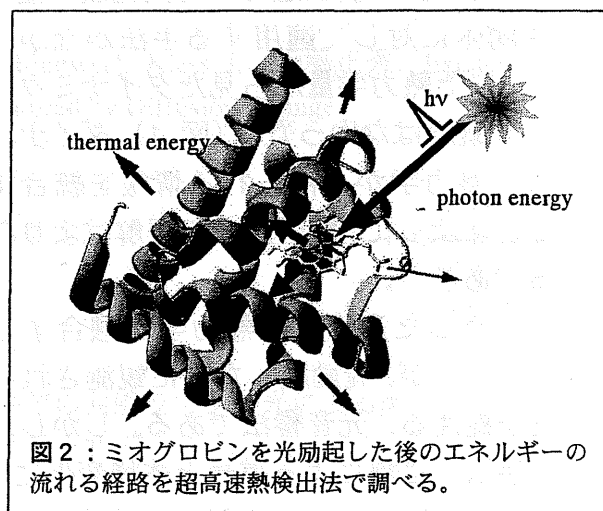


図2：ミオグロビンを光励起した後のエネルギーの流れる経路を超高速熱検出法で調べる。

4-6、蛋白質反応への適用

(a) PYP

Photoactive Yellow Protein (PYP) は水溶性の光受容蛋白質であり、ある種のバクテリアの光走行性に関係した機能を持つと考えられている。この蛋白質がどのようにして機能を発揮しているかの分子論的機構は蛋白質の本質的働きにも関係していると考えられ、多くの興味をもたれている。この蛋白の光反応のトリガーは、蛋白に結合している発色団である p-クマル酸のトランス-シス異性化による。これに引き続いて

の光反応ダイナミクスは、過渡吸収や時間分解 X 線結晶解析など種々の分光法で研究されつつあるが、不思議なことに X 線構造解析で得られた光照射後の構造は光照射前と大きくは変わらず、どのようにして光情報を伝達しているのか、という疑問があった。我々は時間分解過渡回折格子法や光音響法により、エネルギーや蛋白部分の構造変化という新しい観点から研究した。

野生種 PYP の TG 信号を図 3 に示す。信号は励起直後に速い速度で立ち上がり、それに引き続いて $1\mu\text{s}$ ぐらいの比較的ゆっくりとした立ち上がりが観測された。過渡吸収からは、こうした変化は全く観測されず、 3ns の時定数で始めの中間体 pR が生成し、 $100\mu\text{s}$ のオーダーで第二の中間体 pB に変化するとされている。よってここで観測されたダイナミクスは吸収変化を伴わない蛋白部分の構造変化であり、新しい中間体として認知すべきものである。これらを pR₁、pR₂ 中間体と名づけた。

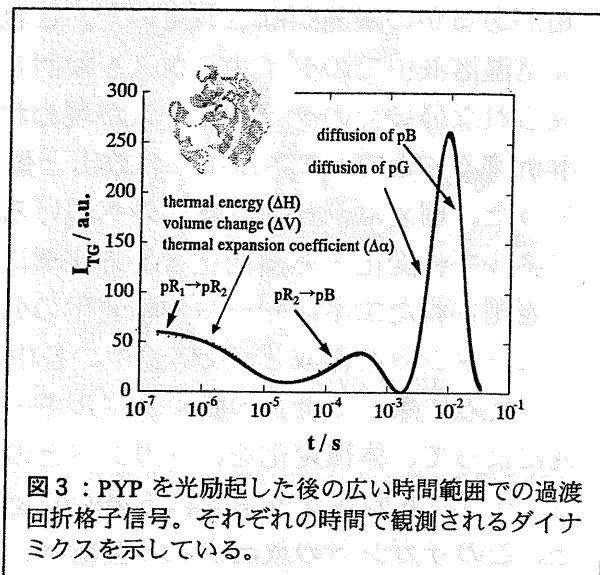


図 3 : PYP を光励起した後の広い時間範囲での過渡回折格子信号。それぞれの時間で観測されるダイナミクスを示している。

更に、反応に伴う蛋白体積変化が 0 C - 20 C の間で変化することを見出しており、これは始めの PYP と中間体 pR の熱膨張係数が異なっているためであると解釈した。これは、反応中間体の蛋白構造が、揺らぎやすいということを示唆するものである。

こうした測定を PYP の変異体 R52Q, P68A, W119G にも適用した。R52 は発色団近くに位置する残基であり、トリガーをかける過程に重要な働きをしていると考えられている。P68 も発色団のついている残基のそばにあり、蛋白全体の構造に役目を果たしていると思われる。W119 は、発色団から比較的遠い位置にある。こうした残基を変えることで、発色団回りと蛋白全体構造とのダイナミクスが区別できるのではないかと予想した。こうした変異体の TG 測定を行ったところ、R52Q, P68A, W119G では野生種より大きな $1\mu\text{s}$ ほどの立ち上がりが観測された。また、いずれの変異体においても、反応に伴う蛋白体積変化には野生種と同じぐらいの温度依存性があり、蛋白全体の構造が揺らぎやすくなっていることがわかった。また、反応座標軸に沿ったエネルギー変化を明らかにし、pR から pB への反応がエンタルピー-drivenであることを示した。更に、拡散係数が pB 中間体において 20% 以上も減少していることを発見し、大きな構造変化の証拠を得た。

(b) ミオグロビン

蛋白質科学研究の代表的な蛋白質であるミオグロビン (Mb) を光励起した後の蛋白ダイナミクスについて、詳細な研究を行った。これまでの多くの研究においては、光によって解離した一酸化炭素のようなリガンドが、どのようにして蛋白質内部から溶媒へ逃げ出していくかを明らかにする努力が続けられていた。しかし、ヘムの光吸

収の変化をモニターしているだけでは、ピコ秒の時間でリガンドが切れたことによる変化、180 ナノ秒でのケージ内再結合過程、ミリ秒の時間領域でリガンドが2分子的に再結合する過程が現れるだけで、リガンドが逃げ出す経路についての情報はおろか、どれぐらいの時間で外へ逃げているかさえははっきりしてなかった。そのため、温度を変えたり、溶媒を変えたり、圧力を変えたり、環境を変えた影響から、どのような経路があるかの議論がなされていた。これに対して、過渡回折格子システムで Mb の働く室温溶液中でのダイナミクスを検討したところ、観測した信号には、過渡吸収では見られない多くのダイナミクスが現われた。この信号成分を開発した手法で定量的に解析することで、エネルギーの放出と蛋白質構造変化のダイナミクスを明らかにしていった。例えば、リガンドが外へ逃げる速度を 700 ナノ秒と決めることができたし、エネルギー変化・体積変化を反応座標に沿って時間分解で決定することができた。

観測されたエネルギーや体積変化の分子論的解釈を行うため、1 アミノ酸残基置換ミュータントを作成し、反応途中の各中間体のエネルギーや体積変化を実時間で決定し、反応に際して蛋白の動くエネルギー曲面を決めた。このミュータントを用いた研究によって、体積変化を、リガンドとの静電的反発、水分子の動き、ヘリックスの動き、リガンドのトラップされる場所の変化など分子論的な寄与に分割することができた。このリガンドの放出される機構が、リガンドの蛋白質内でトラップされた状態における揺らぎの増大のためであることを熱力学量から明らかにした。

蛋白質の構造変化と反応の関係を理解する上で Mb についたリガンドが解離した後、いかなるルートをとって溶媒中へ抜け出るかという問題は、典型的なモデルとして長年に渡って興味が持たれている。本研究により、過渡回折格子法を用いて、Mb からリガンドの抜ける経路を以下のように明らかにした。CO がトラップされる場所については、X線結晶解析による研究より、Mb の内部の Xe トラップサイトのうちの 2 ケ所が CO トラップに関わるらしいことが示唆されているが、溶液中へ CO が放出される室温溶液条件下でこの Xe トラップサイトが本当に関与しているかどうかの直接的な証拠はまだ得られていなかった。Xe 存在下で CO 放出過程と再結合過程がどのように変化するかを時間分解で調べることににより、CO の放出ルートと Xe トラップサイトとの関連を検討した。図 4 に MbCO を光励起した後の TG 信号を示す。サブマイクロ秒の信号には、CO が蛋白質内のヘムトラップサイトから溶媒に放出される過程が体積変化として観

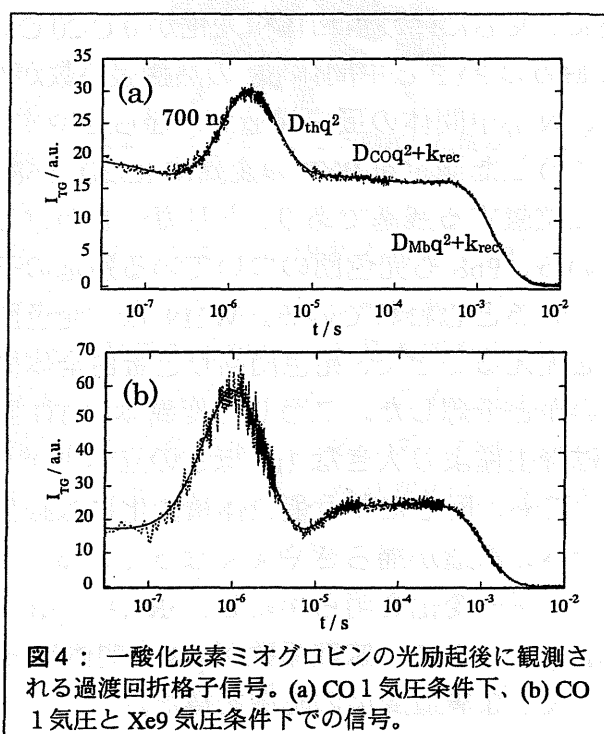


図 4 : 一酸化炭素ミオグロビンの光励起後に観測される過渡回折格子信号。(a) CO 1 気圧条件下、(b) CO 1 気圧と Xe9 気圧条件下での信号。

測され、その後、熱の拡散過程、CO やMbの拡散と再結合による反応過程が観測される。1気圧CO雰囲気下でのCO放出速度は約700nsである。Xe9気圧を封入した場合のTG信号を図4(b)に示す。幾つかの点で変化が見られた。(1) CO放出速度がXe圧力と共に加速され、9気圧においては400nsにまで速くなる。(2) 熱の減衰の後にディップが見られるようになる。(3) 再結合速度が速まる。これらの変化はXe0~6気圧の間で特に顕著であり、N₂との比較から単なる圧力効果ではなくタンパク内部のXeの影響であることがわかった。CO放出速度のXe圧力依存性の変化はXe1サイトの占有数とよい一致を示したことから、COの抜け出る経路にXe1サイトが関係していることが明かになった。このXe1サイトがXeにより塞がれるとCOの抜け出す速度が速くなる現象を幾つかのモデルについて検討したところ、2つの抜け出す経路があると考えられるモデルでよく説明された。このスキームとXe1サイト、Xe4サイトの関係を考えることで、図5のような経路をたどってCOは溶媒へ抜け出していることが明らかにされた。

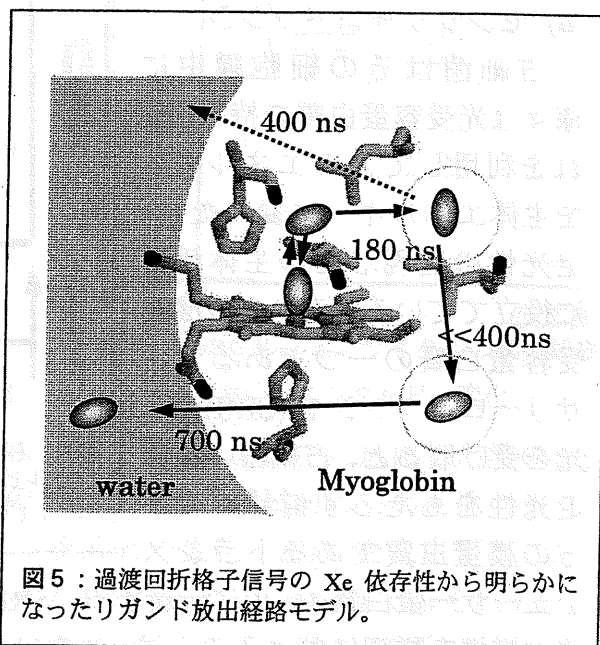


図5：過渡回折格子信号のXe依存性から明らかになったリガンド放出経路モデル。

(c) ロドプシン

蛸のロドプシン反応に適用し、TG法を用いてエネルギーや分子体積の観点でそのダイナミクスを検討し直した。その結果、これまで過渡吸収で捉えられていた中間体以外に、過渡吸収による観測では変化が終わったあとの時間でもまだ信号が変化している過程が観測された。これは発色団周囲の変化が終わった後、引き続いて蛋白部分に変化していることが体積変化として検出されたことを示す。この新しい中間体をトランジエント（過渡）メタロドプシンと名づけた。他の研究結果と考え合わせることで、この新しい中間体こそがG蛋白質と結合し、視覚信号の発生のキー中間体であると結論付けられた。これは、まさにエネルギーや分子体積という観点からダイナミクスを見直すと、これまで見えなかった新しい過程が観測されることを示す。更に、TG法を用いて各中間体のエンタルピー変化と体積変化を、反応が起こる条件下で時間分解測定することに成功した（図6）。これは室温で実際に反応している最中に蛋白質がどのようなエネルギー曲面の上を動いているかを始めて明らかにしたものである。図6には、室温溶液中で時間分解で決められた ΔH と低温トラップ法で求められていた ΔH を示しているが、この両者を比較すると幾つかの中間体では驚くほど一致していたが、ある中間体ではかなり異なっていた。これは低温における構造と、反応中で

の構造でかなり違っていることを示している。

(d) センサリーロドプシン

古細菌はその細胞膜中に様々な光受容蛋白質を持ち、それを利用して光のエネルギーを生体エネルギーに変えたり、走光性の発現などの生体活動に役立てている。そのような光受容蛋白質の一つであるセンサリーロドプシン II (SRII)は、光を受け取ると、古細菌の負の走光性をもたらす信号を相手方の膜蛋白質であるトランス

デューサー蛋白質(HtrII)に伝達する。SRII と HtrII の間に行われるタンパク間情報伝達の機構を詳細に調べることは、生物の細胞内シグナル伝達に対して重要な知見を与えると期待されている。光励起された SRII では、発色団の *all-trans* レチナールが *13-cis* レチナールに異性化した後、レチナールと蛋白質を架橋しているシッフ塩基からプロトンが放出される。このプロトンは SRII のアミノ酸残基の間で受け渡され、それに伴いタンパク質の構造が変化する。光入射後の SRII はいくつかの構造の異なる中間体を経て元の基底状態に戻り、反応フォトサイクルを形成する。一般に、この構造変化を介して SRII は HtrII と相互作用すると考えられており、その機構を調べるにはフォトサイクルの解明が必須である。しかし、このダイナミクスは非常に複雑で、決定的なモデルは提唱されていない。そこで本研究では過渡回折格子法を用いることでフォトサイクルの解明を試み、さらに生理学的条件下での信号伝達過程の検出を目指した。

測定された TG 信号は、pSRII、pSRII-HtrII とも TG 信号は7つの指数関数の和の形で表される。最初の立ち上がりは、励起された pSRII が $pSRII^* \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M$ と異なる中間体へと順次変化していく過程に対応し、100 μs 程の時間には励起された分子から放出された熱の拡散成分が減衰の形で現れている。更に $M \rightarrow M' \rightarrow M'' \rightarrow O$ と変化し、最終的に数百 ms 後、基底状態に戻る様子が観察された。このようにして各々の変成分の寿命を元に pSRII のフォトサイクルは図7のように決定された。また、信号の最後の成分は、分子が反応して基底状態に戻る過程と溶液中を拡散して過渡回折格子構造が失われる過程の二つの速度定数の和で減衰している。生成される回折格子の格子波数 (q) を変化させることで溶液中の分子の並進拡散定数 (D) を決定した結果、この複合体が室温溶液中の界面活性剤内において X 線結晶構造解析から予想されるようなダイマーを形成していることを示唆した。

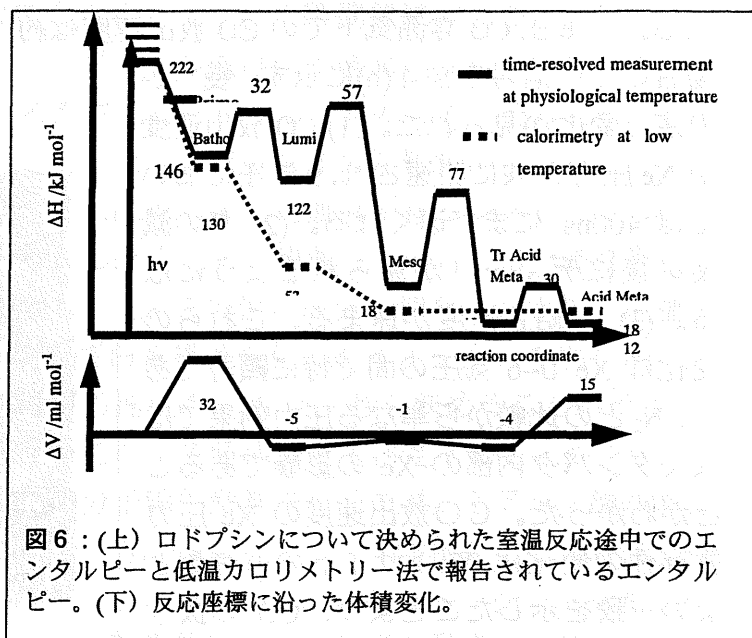


図6：(上) ロドプシンについて決められた室温反応途中でのエンタルピーと低温カロリメトリー法で報告されているエンタルピー。(下) 反応座標に沿った体積変化。

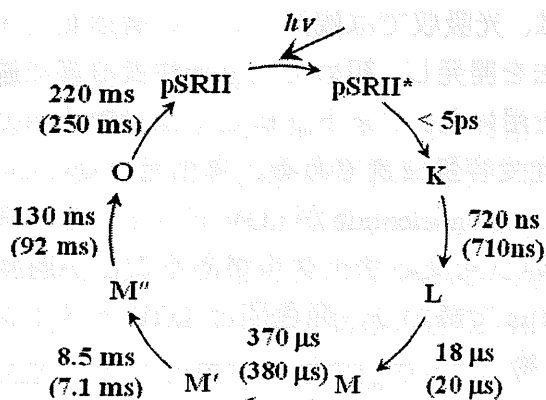


図7 TG法により決定された pSRII の
フォトサイクル (○ 内は pSRII-ΔpHtrII の値)

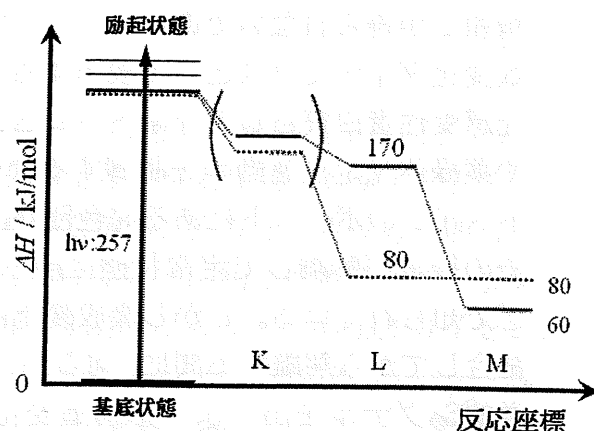


図8 pSRII のフォトサイクルの初期段階に
おけるエンタルピー変化

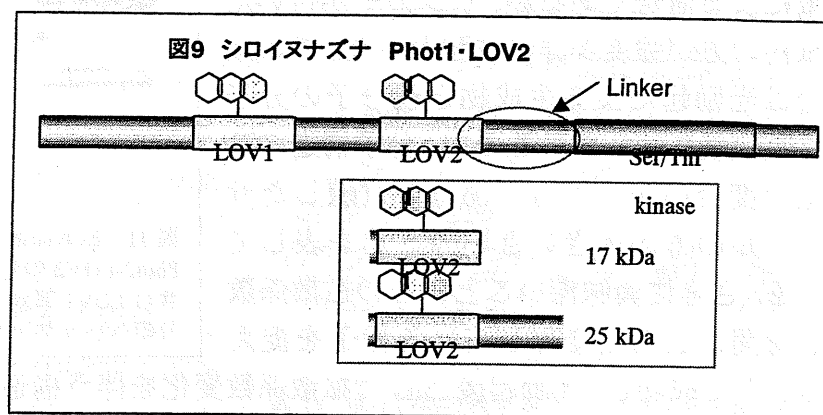
TG 信号には、光励起された pSRII が緩和してくる間に溶液中に放出した熱の拡散過程に対応する信号が得られる。この成分の振幅を熱的参照試料のものと比べることにより、各々の中間体の基底状態からのエンタルピー変化 (ΔH) を決定することができる。pSRII、pSRII-HtrII の L、M 中間体の ΔH を求めると、pSRII ではそれぞれ $\Delta H \leq 170$ kJ/mol、60 kJ/mol であった。一方 pSRII-HtrII ではそれぞれ $\Delta H \leq 80$ kJ/mol、80 kJ/mol で、L 中間体のエネルギーレベルが大きく下がっており、pSRII のこの中間体は HtrII と複合体を形成することで大きく安定化されていることが判った (図8)。

また O→pSRII の過程に対応する変化成分の振幅が両サンプル間で異なっており、pSRII-HtrII 複合体は pSRII のものと比べこの過程において $12 \text{ cm}^3/\text{mol}$ のより大きな収縮が起きており、また M''→O の過程では逆により大きい膨張が起きていた。このことはフォトサイクルの中間体のうち O 中間体において pSRII-HtrII は pSRII よりも基底状態から膨張していることを示している。この体積変化は pSRII からのシグナル伝達を受けて ΔpHtrII が生じた構造変化に対応すると考えらる。本研究において初めて生理学的条件下において、実時間で pSRII、HtrII 間のタンパク質間情報伝達過程を観測することに成功したといえる。

(e) フォトリポリン

光感受性蛋白質がどのようにしてその光情報を生物学的な認識にまで結びつけるかの分子論的機構解明は、非常に重要な問題である。この過程には、光吸収によって誘起される

蛋白質の構造変化や揺らぎが大きな役目を果たしているはずであるが、そうしたダイナミクスを時間分解で検出する手法はそう多くない。最もよく利用されてきたのが、



発色団の吸収変化をモニターする方法であるが、これでは発色団周辺のダイナミクス情報しか得られないであろう。ここでは、光吸収では観測されない構造変化を拡散係数変化ダイナミクスとして検出する手法を開発し、初めて光感受性蛋白質に適用した。光感受性蛋白質としてフォトトロピンを用いた。フォトトロピンは植物体内で光屈性や葉緑体光定位運動等を制御する青色光受容蛋白質である。青色光を受けると LOV ドメインのポケットにある発色団 flavin mononucleotide が LOV ドメインと共有結合し、その後再び解離して定常状態に戻るといふ光反応サイクルがあることが過渡吸収などで知られている。しかし吸収変化は $1\mu\text{s}$ で終わり、発色団と LOV ドメインが共有結合してから解離する間に、何らかの生物学的シグナルを出すような構造変化があることが期待されているが、その過程、特にダイナミクスは未だ明らかにされていない。

パルスレーザー誘起の過渡回折格子法を用いて、分子の拡散過程を速い時間分解能で捕らえた。Phot2LOV2 ドメインのみのサンプルと、リンカーが付いたサンプルを光励起した後に観測された TG 信号を図 10 に示す。両方のサンプルに共通して見られる約 $2\mu\text{s}$ の減衰は励起三重項状態の失活に伴う FMN とのアダクト生成によるものであり、その次に見られる減衰は放出された熱エネルギーによる熱拡散であると同定された。この速度は 2 つのサンプルで違

いはなく、リンカー部分は共有結合生成には影響がないことを示している。その後の立ち上がりで減衰から成る信号は、分子拡散による信号であるが、リンカーが付いた試料の方が強度が非常に強かった。この成分は光励起による生成物と親分子の分子拡散の差を表しているため、分子構造の変化の度合いがリンカー部分が付随したサンプルの方が大きいということを示している。さらに興味深いことにこの拡散係数が時間とともに変化している様子を捉えることに成功し、光励起後 2ms で拡散係数変化を伴う構造変化がリンカー部分で起こっているがわかった(図 11)。これは α ヘリックスが壊れる過程に対応していると解釈した。このダイナミクスは生理学的にも重要な役目を持っているものと考えている。

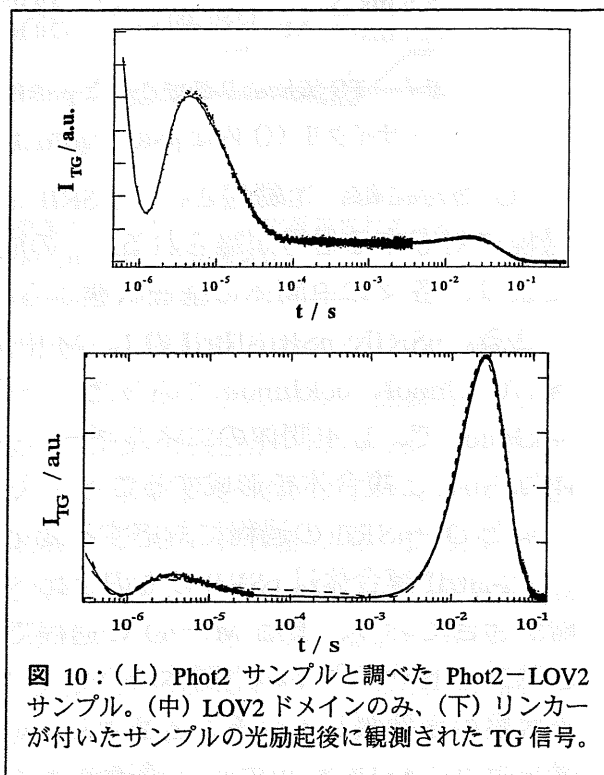


図 10 : (上) Phot2 サンプルと調べた Phot2-LOV2 サンプル。(中) LOV2 ドメインのみ、(下) リンカーが付いたサンプルの光励起後に観測された TG 信号。

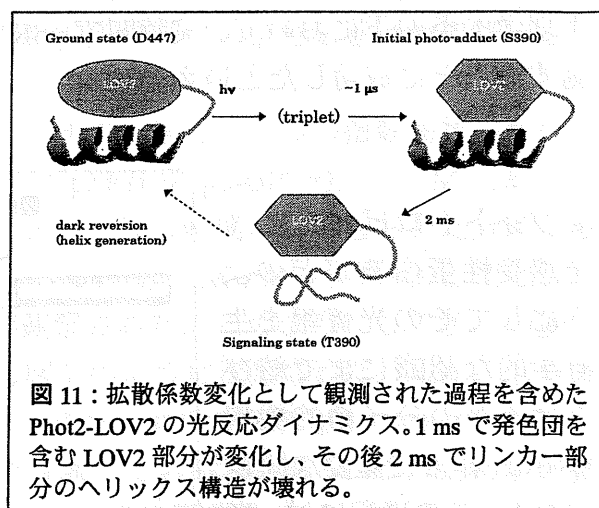


図 11 : 拡散係数変化として観測された過程を含めた Phot2-LOV2 の光反応ダイナミクス。 1ms で発色団を含む LOV2 部分が変化し、その後 2ms でリンカー部分のヘリックス構造が壊れる。

(f) 蛋白質折りたたみ

蛋白質の構造、反応を理解する上で、周囲の水分子との相互作用は重要な因子である。こうした相互作用を拡散係数変化として時間分解で検出する手法を開発した。この手法を、チトクロムcという電子移動にかかわる蛋白質の、折りたたみ反応を明らかにするために用いた。蛋白質の折りたたみ過程における分子間相互作用の時間分解検出のために、パルスレーザー誘起の過渡回折格子 (TG)法によって、NADH 分子を2光子で光励起して溶媒和電子を作り出し、チトクロムcの鉄原子を還元するトリガー法を組み合わせ用いた。チトクロムcの蛋白質構造の安定性は、この鉄原子の酸化状態に依存し、還元状態では酸化状態よりも安定である。よって、パルスレーザーにより、チトクロムcの折りたたみ反応のトリガーをかけることが可能となる。NADHを励起した後の過渡回折格子信号を図12に示した。この信号は、通常のTG信号解析法では説明できず、拡散係数が時間変化していることを示すものであった。

分子の拡散係数は、その分子の動きやすさを表す指標であり、溶液の粘度、温度、分子の大きさなどとともに、分子間相互作用を反映する重要な物理量である。この量が時間変化するという現象はこれまで報告されたことがなく、初めての発見である。解析するために、拡散係数が均一に時間変化しているというモデル (連続体モデル) と、蛋白質が不均一に2状態的に変化しているというモデル (2状態モデル) を考え、定式化を行い、信号のフィットを試みた。その結果、分子間相互作用の変化は2状態モデルで起こっていることを示すことができた。このモデルに基づいたフィットの結果、折り畳みが開始されてから完成するまでの時間範囲で完全に2状態的に拡散係数が変化することがわかった。こうした実験事実と、これまで還元状態のチトクロ

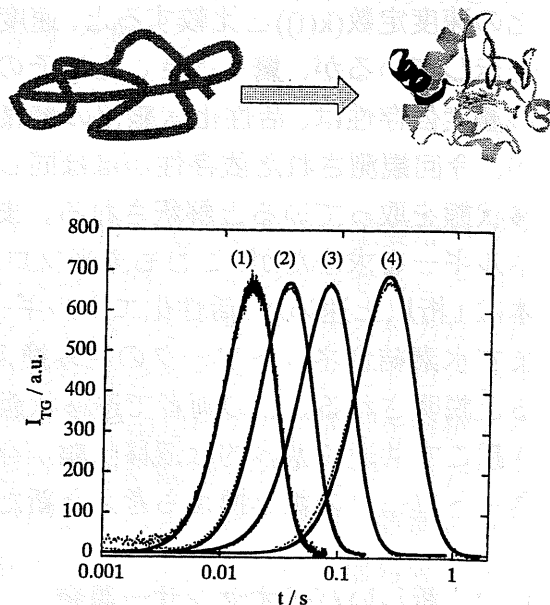


図12: チトクロムCの構造(上)と折りたたみ過程で観測される過渡回折格子信号(下)。(1)から(5)は観測する時間範囲が異なる。点線が実測値であり、実線は2状態モデルに基づいて統一的に解析されたフィット曲線。

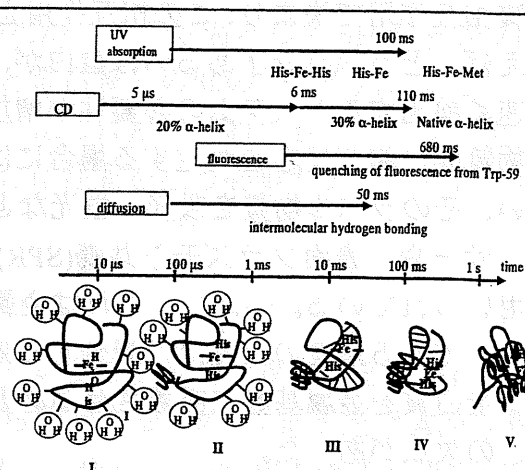


図13: 種々の物理量をモニターすることで得られた還元状態チトクロムCの折りたたみ反応ダイナミクス。

ムcについて同じトリガー法で研究されていた結果より、速い時間スケールでの疎水性相互作用による凝縮(hydrophobic collapse)では分子間水素結合の組み換えはほとんど起こっていないこと、水素結合ネットワークの組み換えは50 msという単一の時定数で起こること、この組み換えから少し遅れて α -ヘリックスの主な部分が完成し、それから最終的にリガンドの組み換えが起こることなどが明らかとなった。(図13)

また、遷移状態についての知見を得るため、変性剤濃度や温度依存性の実験を行った。観測された信号は、どの変性剤濃度でも、折り畳みが開始されてから完成するまでの時間範囲で、完全に2状態的に分子間相互作用が変化するというモデルでよく再現できた。この変化の速度定数($k(D)$)を、蛍光でプローブしたトリプトファン環境変化の速度定数($k(f)$)と比較すると、速度定数は1桁以上水素結合変化のほうが速いことを示しているが、驚くべきことにその変性剤濃度依存性はほとんど同じであった。この濃度依存性は、活性化状態での溶媒露出面積の変化を表していると解釈されているが、今回観測された依存性がほぼ同じということは、両ダイナミクスで同じような遷移状態を取っていると解釈される。また、温度を変えて同様な実験を行い、活性化エネルギーを求めたが、これも蛍光プローブでの折りたたみ速度に比べて $k(D)$ の速度自体は1桁以上速いが、活性化エネルギーはほとんど同じであった。速度定数の違いは、まず水素結合ネットワークの組み換えがおこり、 α -ヘリックスの主な部分が完成すると説明される。この両方で遷移状態が同じということは、蛋白質ダイナミクスを引き起こす共通で基本的な遷移状態が存在するということであり、水分子との水素結合ネットワークの組み換えも考えた新たなモデルを作る必要があると思われる。

4-7. 新しいバイオセンサー開発

構造と拡散係数の関係に着目することで、新しいタイプのバイオセンサーができることを見出した。蛋白質分析はゲノムプロジェクト終了後のターゲットとして、ますます重要になるであろうし、質量分析に代表されるように、蛋白質を構成する成分を知るための蛋白質自体の分析が進展している。しかし、蛋白質の働きは、蛋白質-蛋白質相互作用で決まり、この相互作用を検出するバイオセンサーが、より必要となる。例えば、どういう分子あるいは蛋白が、ある蛋白あるいはDNAと結合するかを簡単に速く検出するシステムの必要性が増加するであろう。従来、ライフサイエンス分野で物質間の相互反応を測定する場合には、多くの場合、放射性同位体で物質の修飾を行い、そのラベル物質を吸光・蛍光などで検出を行っていた。また、質量測定バイオセンサーや、表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーも開発され、特に後者は、多く用いられている。しかし、これは金属表面からの反射光が、表面プラズモンの吸収によってある角度のときだけ減少する効果を利用したものであるため、ターゲットとなる蛋白質を金属基盤に吸着させる必要があったり、精密な温度制御が不可欠であるなどの欠点があった。

これに対して、拡散を利用することで、新しいバイオセンサーを作成した。例えば、SPR法と比較して、次のような利点が考えられる。まず、測定時間が非常に短くてす

む。これは、溶液中でそのまま測定できるためでもあるし、また拡散の計測時間が通常の条件では1秒とかからないほど短いためでもある。SPR センサーでは不可欠の固定用チップが不要のため、カラムクロマトグラフィーと組み合わせることで、分離した蛋白をそのまま活性の測定に用いることができる。更に、拡散係数は蛋白質の結合だけでなく、構造変化にも敏感であるため、ある分子が蛋白構造変化を誘起するかどうかを判定できる、即ち蛋白質の構造を変えるかどうかの基準を通して、薬品の有効性を検出可能になると考えられる。また、安定性だけでなく結合の速度解析が可能となる。こうした特性を考えると、これまでには不可能であった多くの蛋白質活性計測が可能になるであろうことが予想できる。この手法は非常に一般的であるため、今後、蛋白質研究に大きな役割を果たす発展を示すであろう。

4-8、新しい光トリガー法の開発

(a) pH ジャンプ

蛋白質機能や構造的安定性を議論するうえで、溶液の pH は非常に重要なパラメーターである。この pH をパルスレーザーを用いて瞬間的にジャンプさせることができれば、蛋白質の機能や構造に関するダイナミクスを調べることができる有力な手法となるであろう。この光トリガー pH ジャンプ法の研究を行うため、2-ニトロベンズアルデヒド (NBA) の光反応機構を調べた。この分子の光励起後の TG 信号を解析することにより、プロトンの放出と拡散を示す信号を時間分解観測することができた。これは、プロトンが光吸収を持たないことを考えれば驚くべきことであり、観測された信号はプロトンの体積によって現れていると解釈された。実際に、その信号強度からプロトンの部分分子容を決定することができた。光吸収を持たないプロトンの濃度(pH)の測定には、従来は pH 指示薬が用いられるしかなかったかのだが、このように体積変化をモニターすることで、こうした外部試薬なしでプロトンのダイナミクスが測定できることを始めて示すことができたといえる。

本手法をミオグロビンの折り畳みダイナミクスを明らかにするために用いた。その結果、蛋白質の構造変化を示す信号を得たのだが、その原因として pH ジャンプによる影響だけでなく、NBA を光解離した分子と蛋白質との間の相互作用によっても生じていることが分かった。これは、これまでしばしば用いられてきたケージド化合物を蛋白質観測のために用いた場合、その解釈には注意を払う必要があることを示すものである。

(b) ケージド ATP

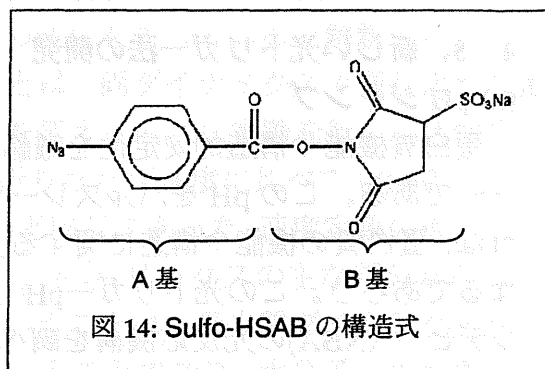
ATP は生命反応のエネルギー通貨であり多くの蛋白質反応に関与する。ATP の関与する蛋白質反応を時間分解熱力学量の観点から研究するために、まず光で ATP を作り出すことのできる、ケージド ATP 光反応を調べ、徐々に ATP が遊離する過程を、拡散係数の時間変化として検出することに成功した。これは種々の理由で吸収を観測できない分子の反応を調べる際に、時間分解拡散係数測定法が大きな威力を発揮するこ

とを示した初めての報告である。

4-9、新しい蛋白質拡散係数測定法

(a) 測定法の開発

近年、蛋白質結晶構造の情報が蓄積されるにつれ、溶液中の蛋白質の構造について多くの興味が注がれてきている。結晶状態と異なり溶液状態では蛋白質分子の構造を測定することは容易ではないが、一つの策として、流体力学情報である拡散係数と関連づけることができる。拡散係数は、分子全体を特徴付けることができ、その形や大きさ、周囲の分子との相互作用を反映する物理量である。したがって、拡散係数測定は溶液中のタンパク質を理解するうえで非常に重要な情報を我々に与えてくれる。これまで遠心沈降法、テイラー分散法、動的光散乱法、パルス磁場勾配 NMR 法などをもちいて拡散係数が測定されてきたが、多くの蛋白質は分子量・サイズともに非常に大きな分子であるため検出可能な距離を拡散するのに長時間かかり、測定時間もそれにしたがって比較的長い。また、装置の規模や複雑な解析などの問題もある。我々は、これらの問題を克服するためにより短時間で簡便な拡散定数測定法として、過渡回折格子法と光ラベル化剤とを組み合わせた手法を開発した。



ここでは代表的な光感受性ヘテロ架橋分子である sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate) を用いた手法を示す。蛋白質溶液に sulfo-HSAB を加えると、まず B 基が蛋白質の第一級アミンと反応して結合した後、A 基が光照射により活性化され非特異的にタンパク質と反応する。まずサンプル蛋白質を微量の光ラベル化剤と混合した後、レーザーパルスを一当たただけで拡散係数の導出に必要なデータを取ることができ、測定に 1 秒かからない。この手法によって、いくつかの蛋白質の拡散係数を測定し、文献値と比較したところ、非常に良い一致が見られた。これは、光に対して安定な蛋白質でも拡散係数を測定できる新しい信頼性のある手法であり、実際に使用できることを示したものと言える。

本手法を多くの蛋白質に適用した。加えて、DNA への応用も試み、DNA に対しても有効であることが確認された。また、蛋白質折れたたみ過程が溶媒相互作用と蛋白質構造変化を伴っていることを考えると、蛋白質構造変化を拡散係数変化から議論することは非常に重要であると思われる。そこで、蛋白質構造と拡散係数との相関を調べるために、その pH 変性過程が詳しく調べられている Mb について、拡散係数の pH 依存性を測定し、その変性中間体構造についての知見を得ることができた。

(b) 拡散係数と 2 次構造との関連

フォールディング問題を初めとする巨大な蛋白質分子の構造変化過程やその溶媒

との相互作用に対する研究は、蛋白質自身の生理的な機能の発現を理解するうえで非常に重要なものとなっている。これまで蛋白質の構造研究には可視・紫外分光法、FTIR、ラマン分光法、円偏光二色性法等の分光学的手法や NMR、小角 X 線散乱などの様々な実験法が用いられてきた。その中で上にも報告したように、蛋白質の構造変化を拡散定数の時間変化を通して調べるのが、過渡回折格子法を用いることによって可能になってきた。しかし、蛋白質が構造を変えたときにどのようにして拡散定数の変化になって現れるのか、その相関関係についてはわかっていない部分が多く、拡散定数の値から蛋白質自身の構造や溶媒との相互作用を研究する上ではその知識が重要になる。本研究では蛋白質の構造変化と拡散定数の相関を明らかにするため、モデル化合物であるポリ-L-グルタミン酸 (PLG) について調べた。このポリペプチドは水溶液中で pH5.5 あたりを境として、pH が低くなるとランダムコイル状態から α -ヘリックスへと大きく構造を変化させることが知られている。この構造変化に伴うポリペプチドの拡散定数変化を測定することで、蛋白質の二次構造と拡散定数の相関に対する知見を得ることを目指した。PLG の溶液に塩酸を加えて pH を変え、拡散定数の pH 依存性を測定したところ、pH 6.0 付近までは pH を下げてもあまり拡散定数に変化は無いが、その後徐々に大きくなり最終的に α -ヘリックスを形成するような pH 5.0 以下で一定となった。ここからランダムコイル状態にあった PLG が α -ヘリックスに構造変化をすると、拡散定数がおおよそ 1.4 倍大きくなることが分かった。このように、拡散定数の変化の様子からより詳しいペプチド-溶媒の相互作用変化を研究出来ることを明らかとした。

4-10、高速構造変化測定法

フェムト秒からナノ秒で起こる超高速屈折率変化を画像解析する手法を開発した。この手法をガラスの構造変化モニターとして用いて、従来の手法では分からなかった音波の発生や高速過熱の様子をリアルタイムで観測し、その分子論的機構を解明した。

光照射により分子を光解離させ、生理学的に有用な分子を作り出す方法は、ケージド化合物として知られ、生物物理や医学をはじめとして多くの分野で用いられている。また、細胞などを顕微鏡で観測しつつ、光刺激を行って応答を観測することもしばしば行われている。こう

した場合、光照射を受けた場所では何が起きているのであろうか。常識的には、光

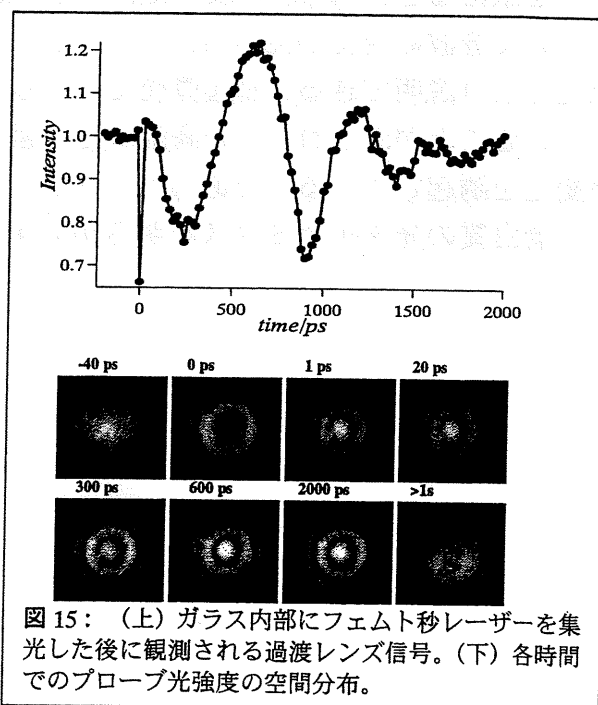


図 15: (上) ガラス内部にフェムト秒レーザーを集光した後に観測される過渡レンズ信号。(下) 各時間でのプローブ光強度の空間分布。

励起状態からの緩和により温度上昇が起こり、熱膨張しているはずであるが、こうした微小領域での、しかも吸収では見えない現象を実時間で観測するのは非常に困難である。ここでは、集光点での温度上昇と音波発生の初期状態を実時間で観測する手法を開発した。生体分子関係では、まさに集光したレーザー光で生体組織が切断されるところを観測していることに対応する。

集光した領域の高速時間分解観測のために、我々が開発した過渡レンズ (TrL) 法と呼ぶ手法を用いた。TrL では、ガウス型の空間分布を持つ励起光を対物レンズを通してサンプルに照射し、集光部分のレンズ効果を、プローブ光強度を測定したり、CCD カメラでビーム形状をモニターして解析する。赤外のフェムト秒レーザー光をガラス内部に集光した後の TrL 信号を図 15 に示す。中心の光強度は、初めに減少した後 100fs 内でもとの強度まで戻り、10ps ほどから再び減少を始め、以降振動しつつ減衰する様子が観測された。はじめに生成する信号は、そのフェムト秒の時間応答から光カーレンズ成分であると同定された。これに続く振動する信号の由来を調べるため、プローブ光の空間形状を CCD カメラで測定した(図 15)。この形状変化はポンプ光の焦点で起こる屈折率の空間分布を反映している。この形状より屈折率分布を求めると、図 16 のように、中心の屈折率が急激に小さくなり、外部へと進行していく音波の発生が見られた。こうした現象は、電子エネルギーによる発熱と音波発生により説明できる。励起直後では 4000K の温度上昇と 0.3 Gpa の圧力上昇が起こっていることが示され、この高温高压状態での構造変化が、早い時間で見られる屈折率変化を誘起しているのであろうことが示唆された。この新しい手法は、顕微鏡を用いて蛋白質の光ダイナミクスを明らかにする上でも有用と考えられる。

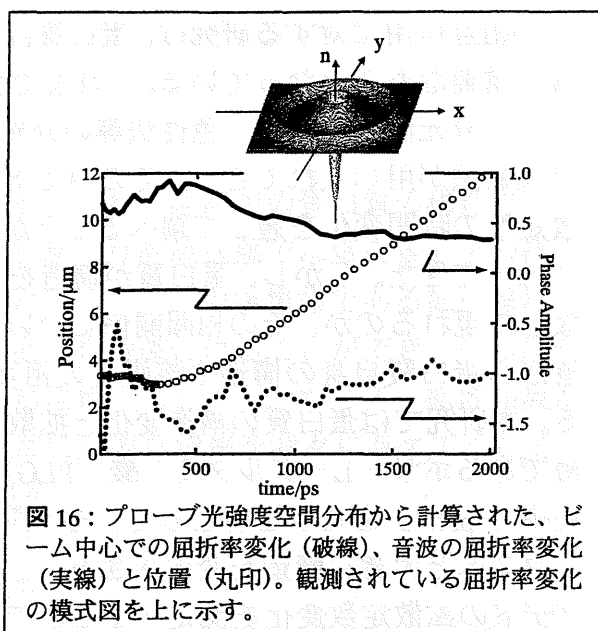


図 16: プローブ光強度空間分布から計算された、ビーム中心での屈折率変化(破線)、音波の屈折率変化(実線)と位置(丸印)。観測されている屈折率変化の模式図を上を示す。